

**„Klinische Bedeutung von Nucleophosmin- und FLT3-
ITD-Mutationen bei Patienten mit Akuter Myeloischer
Leukämie über 60 Jahre“**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Claudia Theuer**
geboren am 16. Juni 1974 in Stendal

Gutachter

- 1. Prof. Dr. K. Höffken, Jena**
- 2. Prof. Dr. J. Beck, Jena**
- 3. Prof. Dr. M. Herold, Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.01.2011

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Genbezeichnung, kodiert Proteinkinase B (Onkogen)
AL	activation loop
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ARF	ADP-ribosylation factor
AW	Waschpuffer
BAALC	brain and acute leukemia, cytoplasmic
bp	Basenpaar
CALGB	Cancer and Leukaemia Group B
CBF	core binding factor
CD	cluster of differentiation
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein α
CML	Chronisch myeloische Leukämie
c-Myc	zelluläres Myc (Oncogen)
CR	komplette Remission
Del	deletion
ddNTPs	Didesoxynukleosidphosphat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
ECOR I	Restriktionsendonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	ETS related gene
ETS	E26 transformationsspezifisch
FAB	French-American-British
FLT3	FMS related tyrosine kinase 3 (Gen)
HDM2	human homologue of “murin double minute gene”2
HLA	human leukocytes antigen
inv	Inversion
ITD	internal tandem duplication
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

JM	juxtamembranär
KM	Knochenmark
LB	luria broth
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDR	Multi-Drug Resistenz (Gen)
MLL	Myeloid/lymphoid leukemia Gen
MIZ-1	Myc-interacting zinkfinger protein 1
NPM1	Nucleophosmin Member 1
PB	peripheres Blut
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phospho-buffered-saline)
PBSCT	periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor (Plättchenwachstumsfaktor)
PIM1	Protoonkogen, codiert Serine/Threonin-Proteinkinase 1
p15	Tumorsuppressorgen 15
p21	Tumorsuppressorgen 21
p53	Tumorsuppressorgen 53
RAS	rat sarcoma
RT	Raumtemperatur
rmp	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SLS	Sample loading solution (deionisiertes Formamid)
SOC	Bakterienmedium
SSCP	DNA-Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5
t	Translokation
TAE	Tris-acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase
TKD	Tyrosinkinasedomäne
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
x-Gal	Bromchlorindolylgalaktosid

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	3
	Die akute myeloische Leukämie	3
1.1	Allgemeine Aspekte	3
1.2	Diagnostik und Klassifikation	4
1.3	Prognosefaktoren	4
1.4	Therapie	5
1.5	Allgemeine Pathogenese der AML	7
2	Die AML bei älteren Patienten	8
2.1	Epidemiologie	8
2.2	Prognosefaktoren bei älteren AML-Patienten	10
2.3	Therapie bei älteren Patienten	10
3	Mutationen von Nukleophosmin (NPM1)	11
3.1	Struktur und Funktion des NPM1	11
3.2	NPM1 Mutationen und deren klinische Bedeutung bei der AML	13
4	Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3	15
4.1	Struktur und Signalübertragung von FLT3	15
4.2	Bedeutung von FLT3-Mutationen AML	16
III.	Ziele der Arbeit	20
IV.	Patienten, Material und Methoden	22
A	Patienten	22
1	Allgemeine Angaben	22
2	Therapie	23
3	Kriterien des Therapieansprechens	23
B	Statistische Analysen	24
1	Endpunkte	24
2	Software	24
3	Verwendete statistische Tests	24
C	Material	25

1	Chemikalien	25
2	Enzyme	25
3	Primer	26
4	Sonstige	26
D	Methoden	27
1	Zellkultivierung	27
2	Molekularbiologie	27
2.1	DNA-Isolierung	27
2.2	PCR-Methoden und DNA-Elektrophorese	28
2.2.1	Untersuchung auf FLT3-ITD-Mutationen	29
2.2.2	PCR zur Analyse von Nukleophosmin-Mutationen	30
2.3	Fragmentanalyse von Nukleophosmin-Mutationen	31
2.4	Klonierung und Sequenzierung	32
2.4.1	Klonierung von PCR-Fragmenten	32
2.4.2	Transformation	34
2.4.3	Plasmidpräparation	35
2.4.4	Restriktionsanalyse der Plasmide	35
2.4.5	Fragmentanalyse der Plasmide	36
2.4.6	Sequenzierung nach SANGER	36
3	Zytogenetische Analyse	39
V.	Ergebnisse	40
1.	Ergebnisse experimenteller Teil	40
1.1	Nachweis von FLT3-ITD-Mutationen	40
1.2	Nachweis von NPM1-Mutationen	40
1.3	Sequenzanalyse von NPM1-Mutationen	42
2.	Klinische Daten und statistische Analysen	43
2.1	Patientencharakteristika	43
2.2	Statistische Analysen	44
2.2.1	Klinischer Verlauf in Abhängigkeit vom Therapieregime	44
2.2.2	Klinischer Verlauf in Abhängigkeit von der Zytogenetik	46
2.2.3	Klinischer Verlauf in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	48
2.2.4	Ansprechraten auf die Therapie in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	48

2.2.5	Charakteristika der NPM1-positiven Fälle	49
2.2.6	Einfluss von NPM1-Mutationen auf das krankheitsfreie sowie auf das Gesamtüberleben	50
2.2.7	Einfluss isolierter NPM1-Mutationen auf Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben	51
2.2.8	Charakteristika aller FLT3-positiven Fälle	53
2.2.9	Einfluss der FLT3-ITD-Mutation auf das Überleben	54
2.2.10	Weitere Subgruppenanalysen	56
2.2.11	Analyse der palliativ therapierten Patienten	56
VI.	Diskussion	60
VII.	Schlussfolgerungen	68
VII	Literaturverzeichnis	71

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Nukleophosmin
- Abb. 2: Skizze Pathobiochemie NPM1
- Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus von FLT3
- Abb. 4: Skizze Pathobiochemie von FLT3
- Abb. 5: Detektion von FLT3-Mutationen
- Abb. 6: Detektion von NPM1-Mutationen
- Abb. 7: Sequenzanalyse von NPM1-Mutationen
- Abb. 8: Gesamtüberleben in Abhängigkeit der angewandten Therapiemodalität (kurativ vs. palliativ vs. supportiv)
- Abb. 9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der zytogenetischen Risikogruppe (nicht ungünstig vs. ungünstig)
- Abb. 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Nachweis einer NPM1 Mutation
- Abb. 11: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom NPM1-Mutationsstatus
- Abb. 12: Krankheitsfreies Überleben Gruppe 1 versus Gruppe 2 (NPM1 mutiert vs. NPM1 WT ohne FLT3)
- Abb. 13: Gesamtüberleben Gruppe 1 versus Gruppe 2 (NPM1 mutiert vs. NPM1 WT ohne FLT3)
- Abb. 14: Krankheitsfreies Überleben Gruppe 1 plus 2 (alle FLT3-ITD-negativen Patienten) versus Gruppe 3 plus 4 (alle FLT3-positiven Patienten)
- Abb. 15: Gesamtüberleben Gruppe 1 plus 2 (alle FLT3-ITD-negative Patienten) versus Gruppe 3 plus 4 (alle FLT3-positiven Patienten)
- Abb. 16: Vergleich zwischen Patienten mit bzw. ohne NPM1 Mutation (palliativ)
- Abb. 17: Vergleich zwischen Patienten mit FLT3-ITD-Mutation bzw. FLT3- WT (palliativ)
- Abb. 18: Vergleich aller NPM1 positiven Patienten in Bezug auf das zusätzliche Vorhandensein einer FLT3 ITD-Mutation bzw. ohne (palliativ)

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	French American British (FAB) Klassifikation der AML
Tab. 2:	CALGB-Klassifikation zur Prognoseabschätzung der AML auf Grundlage wichtiger zytogenetischer Marker
Tab. 3:	Häufige Mutationen bei AML und deren klinische Bedeutung
Tab. 4:	Darstellung der wichtigsten FLT3 Mutationen
Tab. 5:	Klinische Daten aller untersuchten Patienten
Tab. 6:	Verwendete Primer
Tab. 7 :	Patientencharakteristiken Teil I - allgemeine Daten
Tab. 8:	Patientencharakteristiken Teil II - Patienten geordnet nach zytogenetischen Risikoprofil und Therapieansatz
Tab. 9:	Patientencharakteristiken Teil III - Aufteilung der Patienten nach molekularen Subgruppen und Therapieansatz
Tab. 10:	Medianes Überleben und Ansprechraten bezogen auf die molekularen Subgruppen
Tab. 11:	Verteilung NPM1 Mutation in den zytogenetischen Risikogruppen
Tab. 12:	Verteilung des FLT3-Mutationstatus in Bezug auf die zytogenetischen Risikogruppen
Tab. 13:	Überlebenszeit aller palliativ therapierten Patienten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

I Zusammenfassung

NPM1-Mutationen und FLT3-ITD-Mutationen sind neben weiteren molekularen Veränderungen häufige Ereignisse bei der AML. NPM1 Mutationen sind in ca. 35% und FLT3-ITD-Mutationen in ca. 25% der Erkrankungsfälle nachweisbar. Sie sind häufig vergesellschaftet mit einem unauffälligen zytogenetischen Befund.

Da fehlende zytogenetische Veränderungen bei der AML mit einem intermediären Risiko einhergehen und die Datenlage für Patienten über 60 Jahre begrenzt ist, wurden die genannten Mutationen auf ihre prognostische Wertigkeit untersucht.

Bei Patienten im Alter bis zu 60 Jahre konnten die NPM1-Mutation als prognostisch günstige Veränderung herausgearbeitet werden. Der Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation hingegen besitzt eine negative prognostische Bedeutung mit Auswirkung auf die Überlebenszeit und das krankheitsfreie Überleben.

Die bisher durchgeführten Analysen zu diesem Thema wurden nahezu ausschließlich an einem Patientengut durchgeführt, bei dem die obere Altergrenze bei 60 Jahren lag. Vereinzelt waren auch ältere Patienten in das Gesamtpatientenkollektiv eingeschlossen, aber nie das Ziel gezielter Betrachtungen.

Ältere Patienten mit einer AML stellen jedoch eine gesondert zu betrachtende Patientengruppe dar. Dies ist besonders auf den erhöhten Anteil sekundärer Erkrankungen und einen größeren Anteil prognostisch ungünstiger zytogenetischer Veränderungen zurückzuführen. Weiterhin stellen der ältere Patient an sich, sowie die zunehmende Inzidenz und Schwere der Komorbiditäten unabhängige Risikofaktoren dar, die nicht nur die Prognose der Erkrankung beeinträchtigen sondern zusätzlich eine intensive Therapie zu einem großen Teil unmöglich machen. Zudem besteht per se eine altersabhängige Inzidenz der Erkrankung mit einem medianen Alter von 63 Jahren bei der Erstdiagnose.

Ziel dieser Arbeit war es, bei der Gruppe von Patienten mit einem Lebensalter über 60 Jahren das Vorhandensein von NPM1-Mutationen bzw. FLT3-ITD-Mutationen und deren Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen.

Hierzu wurden in einer retrospektiven Analyse die asservierten Knochenmarkproben neu diagnostizierten AML-Patienten älter als 60 Jahre mittels molekularbiologischer Techniken auf das Vorliegen von FLT3-ITD- sowie NPM1-Mutationen untersucht und die Ergebnisse unter Berücksichtigung der klinischen Daten statistisch ausgewertet. Als methodische Grundlage diente jeweils die Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von aus den

Proben isolierter genomischer DNA. Insbesondere zum Nachweis von NPM1-Mutationen erfolgte die Detektion des mutierten Allels mittels Fragmentanalyse.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Patienten mit nachweisbarer NPM1-Mutation im Vergleich zu den vorliegenden Daten bei Patienten unter 60 Jahren etwas geringer liegt. Diese treten mit über 80% zu einem wesentlich größeren Anteil in der Gruppe der Patienten mit „nicht ungünstiger“ Zytogenetik auf als bisher bei jüngeren Patienten angegeben. Obwohl nicht statistisch signifikant zeigt sich ein deutlicher Trend dahingehend, dass bei Vorhandensein einer isolierten NPM1-Mutation sowohl das Gesamtüberleben als auch das krankheitsfreie Überleben länger ist als ohne NPM1-Mutationsnachweis. Zudem ergeben sich Hinweise auf eine bessere Remissionsinduktion bei Vorhandensein einer NPM1-Mutation bei parallelem Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation. Dies gilt für die Gruppe der kurativ therapierten Patienten.

Bei einem palliativen Therapieansatz zeigt sich kein Überlebensvorteil bei Vorliegen der NPM1-Mutation im Vergleich zu den Patienten ohne Mutationsnachweis. Jedoch zeigt sich auch hier, dass die negative Wertigkeit der FLT3-ITD-Mutation durch das zusätzliche Vorhandensein einer NPM1-Mutation aufgehoben, jedoch im Vergleich zu den kurativ therapierten Patienten nicht verbessert wird.

Der Anteil der FLT3-ITD-Mutation im Patientenkollektiv liegt ebenfalls deutlich unter dem Anteil, der bisher für jüngere Patienten beschrieben wurde. Das Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation beeinflusst statistisch signifikant ungünstig sowohl das Gesamtüberleben als auch das krankheitsfreie Überleben bei den kurativ therapierten Patienten.

Für die palliativ therapierten Patienten zeigt sich derselbe Trend, ohne statistisch belegt werden zu können.

Diese Ergebnisse sind insbesondere unter Berücksichtigung sich derzeit in Prüfung befindender neuerer Therapieoptionen in Bezug auf die FLT3-ITD-Mutation, insbesondere den Tyrosinkinase-Inhibitoren mit Wirkung auf FLT3 von Bedeutung. Dies betrifft neben den kurativ und intensiv therapierten Patienten auch die palliativen Therapieansätze.

Zudem wird eine bessere Risikostratifizierung, insbesondere bei den Patienten mit normaler Zytogenetik möglich, die einen Einfluss auf die Entscheidung der Art der Postremissionstherapie (konventionelle Chemotherapie vs. zusätzlich allogene Blutstammzelltransplantation) haben könnte.

II Einleitung

1 Die akute myeloische Leukämie

1.1 Allgemeine Aspekte

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei welcher es durch die maligne Entartung myeloischer Vorläuferzellen zu einer Verdrängung des gesunden blutbildenden Knochenmarkes kommt. Sie ist mit 75-80% die häufigste Form der akuten Leukämien des Erwachsenenalters.

Die maligne entarteten leukämischen Zellen verlieren die Fähigkeit der normalen Ausreifung und Differenzierung und entziehen sich den normalen Mechanismen der Wachstumskontrolle. Hierdurch kommt es zu einer Expansion des malignen Zellklones und einer Verdrängung des gesunden Knochenmarkes. Weiterhin wird die Ausreifung „gesunder Vorläuferzellen“ auch direkt über Chemokine verhindert, welche von den AML-Blasten produziert werden (Youn et al. 2000). Dies ruft eine Insuffizienz der Hämatopoese mit Verminderung bzw. Funktionsverlust aller Zellreihen hervor. Anämie, Thrombopenie und eine Abwehrschwäche durch die zahlenmäßige Reduktion gesunder Granulozyten sind die Folge. Blutungen und Infektionen entstehen und stellen die häufigsten Todesursachen bei dieser Erkrankung dar.

Die unbehandelte AML ist eine Erkrankung mit infauster Prognose und hat eine sehr schlechte Überlebensrate. Das mediane Überleben beim ausschließlichen Einsatz von supportiven Maßnahmen wie z. B. die Gabe von Blutprodukten und Behandlung von Infektionen liegt bei 11 bis 22 Wochen (Deschler und Lübbert 2006).

Das mediane Alter der AML-Patienten beträgt 63 Jahre (Schaich et al. 2006). Die durchschnittliche Inzidenz der Erkrankung liegt bei ca. 4/100000 Personen, wobei eine starke Altersabhängigkeit besteht. So treten bei der Bevölkerung bis 65 Jahre durchschnittlich 1,8 Erkrankungen/100000 Personen auf, während die Zahl bei den über 65jährigen auf ca. 18/100000 ansteigt (Deschler und Lübbert 2006).

Man unterscheidet zwischen der primären Form (de novo AML) und der sekundären AML. Risikofaktoren für die Entstehung einer sekundären Erkrankung wie genetische Veränderungen, physikalische oder chemische Reize, eine Strahlenbelastung oder eine voraus gegangene Chemotherapie betreffen nur einen kleinen Teil der Patienten. Ein möglicher Einfluss viraler Infektionen (Parvovirus B19) wird kontrovers diskutiert. Das Risiko, an einer

AML zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter und bei vorbestehenden hämatologischen Erkrankungen. Insgesamt bleibt die Ätiologie meist unklar (Deschler und Lübbert 2006).

1.2 Diagnostik und Klassifikation

Die Diagnose einer AML wird gestellt, wenn sich im Knochenmarkaspirat des Patienten mehr als 20 % myeloisch differenzierte Blasten nachweisen lassen. Zur genauen Einordnung der Blastendifferenzierung (myeloisch, lymphatisch, morphologische Subtypisierung) werden die mikroskopische Beurteilung einschließlich spezieller zytochemischer Färbungen, immunzytologische und zytogenetische Untersuchungen kombiniert.

Die lange Zeit gültige French American British-Klassifikation (FAB) nach rein morphologischen Gesichtspunkten (siehe Tabelle 1) wird häufig in Kombination mit der der CALGB (Cancer and Leukemia Group B)-Klassifikation zur prognostischen Subtypisierung der AML auf Basis der zytogenetischen Diagnostik (Tabelle 2) verwendet.

FAB	Subtyp
M0	AML ohne Ausreifung
M1	AML mit minimaler Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5a	Akute Monoblastenleukämie ohne Ausreifung
M5b	Akute Monoblastenleukämie mit Ausreifung
M6	Akute Erythrozytenleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Tab. 1: French American British (FAB)-Klassifikation der AML

Die von der WHO im Jahre 1997 entwickelte und im Jahre 2008 erneuerte Klassifikation beinhaltet zytogenetische, molekulargenetische, und morphologische Aspekte sowie die unterschiedliche Genese der Erkrankung.

Prognosegruppe	
günstig	t(8;21), inv(16)/t(16;16), del(9q)
intermediär	normaler Karyotyp, -Y, +8, t(9;11), +11, +13, del (5q), del (7q)
schlecht	inv(3)/t(3;3), t(6;9), t(6;11), t(11;19), +8, -7, komplex aberranter Karyotyp (≥ 3 Aberrationen)

Tab. 2: CALGB-Klassifikation zur Prognoseabschätzung der AML auf Grundlage wichtiger zytogenetischer Marker

1.3 Prognosefaktoren

Die wichtigsten Prognosefaktoren der AML sind der Karyotyp der leukämischen Blasten und das Alter des Patienten. Weiter klinische Faktoren sind die Höhe der Leukozytenzahl, eine sekundäre Genese der Erkrankung und das Ansprechen auf die erste Induktionschemotherapie. Neuere Daten belegen zudem, dass verschiedene molekulare Veränderungen, wie insbesondere das Vorhandensein einer FLT3-Längenmutation oder eine Mutation im Nukleophosmin1-Gen, sowie auch eine Reihe weiterer Veränderungen ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Erkrankung haben können. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 3.

Bezüglich des Karyotypes unterscheidet man balancierte von unbalancierten Translokationen. Zu den balancierten Translokationen gehören t(8;21) (q22;q22), t(15;17) (q22;q12) und die Inversion 16 mit einer insgesamt positiven Prognose. Die Translokationen mit Beteiligung der Bande 11q23 sowie die inv(3) (q21q26)/ t(3;3) (q21;26) sind mit einer schlechten Prognose assoziiert. Zu den unbalancierten Aberrationen gehören Veränderungen an den Chromosomen 5 und 7 sowie der komplex aberrante Karyotyp jeweils ebenfalls mit einer schlechten Prognose.

1.4 Therapie

Die kausale Therapie der AML erfolgt mittels zytostatischer Chemotherapie, welche über eine Zerstörung der leukämischen Blasten zur Wiederherstellung der normalen Hämatopoese führen soll. Hierbei kommen bis heute insbesondere 2 Substanzen zum Einsatz: der Pyrimidinantagonist Cytarabin in Kombination mit einem Antrazyklinen. Weitere

Kombinationen zum Beispiel mit Etoposid, Thioguanin und auch Fludarabin wurden kontrovers diskutiert und haben sich in der Primärtherapie bisher nicht etablieren können. Das empfohlene Schema ist unverändert das so genannte „3 +7 Schema“, bestehend aus drei Gaben Antrazyklinen in Kombination mit Cytarabin, insgesamt über sieben Tage verabreicht. Kurativ ausgelegte Therapiestrategien bestehen nominell aus zwei Teilen. Der erste Teil stellt die so genannte Induktionstherapie dar. Deren Ziel ist die Rückführung der AML in eine komplette Remission, welche definiert ist als ein Blastenanteil im Knochenmark von unter 5% nach erfolgter Therapie und vollständiger Blutbildregeneration (Cheson et al. 2003). Je nach Therapieansprechen bedarf es mitunter mehrerer Induktionstherapien oder des Wechsels des Therapieregimes, um eine komplette Remission zu erreichen. Nach Erreichen derselben ist jedoch weiterhin von einem Vorhandensein residueller leukämischer Blasten auszugehen, so dass sich eine konsolidierende Therapie entweder in Form von mehrfach wiederholten Chemotherapiezyklen oder als Kombination aus Chemotherapie und allogener Blutstammzelltransplantation anschließen muss. Inwieweit eine allogene periphere Blutstammzelltransplantation (PBSCT) in das Therapiekonzept einbezogen wird, hängt zum einen vom Vorhandensein eines HLA-identen verwandten Spenders und vom Alter des Patienten ab. Bei Patienten jünger als 60 Jahre und Vorhandensein eines HLA-identen Geschwisterspenders ist die allogene PBSCT die Konsolidierungstherapie der Wahl, insofern keine zytogenetischen Aberrationen mit günstiger Prognose nachgewiesen werden. In letzterem Fall würde sich lediglich eine konsolidierende Chemotherapie anschließen. Bei Nachweis einer ungünstigen zytogenetischen Aberration ist prinzipiell die allogene Stammzelltransplantation nach einer Remissionsinduktion indiziert und hängt dann vom Vorhandensein eines Stammzellspenders ab. Eine dauerhafte Krankheitsfreiheit und somit Heilung der Erkrankung ist momentan lediglich bei ca. 30 – 40% aller Patienten möglich (Kern et al. 2003).

Eine Besonderheit ergibt sich bei der Behandlung der Promyelozytenleukämie (FAB M3). Bei dieser Unterform der AML liegt die Translokation t(15;17) vor, was zur Zusammenlagerung des Retinolsäurerezeptors α mit dem so genannten PML-Gen führt. Durch das resultierende pathologische Fusionsprotein PML-RAR α wird der Differenzierungsblock verursacht. Durch Kombination der konventionellen Chemotherapie mit dem Vitamin-A-Säure-Derivat *all-trans*-Retinolsäure (ATRA) können dieser Differenzierungsblock überwunden und Heilungsraten von 70 - 80 % bei der Promyelozytenleukämien erreicht werden (Collins 1998, Kern et al. 2003, Cheson et al. 2003).

1.5 Allgemeine Pathogenese der AML

Während die Ätiologie der AML meistens unklar bleibt, ist die Pathogenese der Erkrankung bereits sehr gut erforscht.

In den letzten Jahren konnten die Kenntnisse über eine Reihe von molekularer Veränderungen, die in einem erheblichen Maß an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind und wichtige Signalmoleküle, welche an der Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt sind betreffen, sehr erweitert werden

Basierend auf der so genannten „two-hit Hypothese“, die davon ausgeht, dass mindestens 2 voneinander unabhängige molekulare Veränderungen notwendig sind, um eine maligne Entartung der Zelle zu erreichen, werden diese Veränderungen in Bezug auf die AML in zwei große Gruppen unterteilt (Knudson 1971). So genannte „Klasse I-Mutationen“ bewirken die unkontrollierte Aktivierung von Signalmolekülen. Dies führt zu einer Fehlregulation wichtiger zellulärer Ereignisse wie Proliferation oder des programmierten Zelltodes. Die Zelldifferenzierung ist hiervon meistens nicht betroffen. Dieser Mechanismus trifft z. B. für die FLT3-Mutationen. (Gilliland und Griffin 2002, Levis und Small 2003) aber auch für RAS-Mutationen (Deschler und Lübbert 2006) zu. Als Folge kommt es sowohl zu einer vermehrten Proliferation als auch zu einem Differenzierungsblock der Zellen. „Klasse II-Mutationen“ betreffen Transkriptionsfaktoren oder wichtige Bestandteile derselben. Eine Fehlsteuerung der Differenzierung der betroffenen Zellen ist das Ergebnis. Gut charakterisierte Beispiele hierfür sind hier die verschiedenen Mutationen des Transkriptionsfaktors C/EBP α (Leroy et al. 2005) oder auch AML/ETO sowie PML/RAR. NPM1-Mutationen betreffen mutmaßlich vorwiegend Differenzierungsprozesse.

In Tabelle 3 ist eine Auswahl der bisher bekannten Mutationen bei AML einschließlich ihrer klinischen Bedeutung zusammengetragen.

Neben der kausalen Bedeutung der molekularen Veränderungen für die Pathogenese der Erkrankung können diese gleichzeitig zum einen als Marker bei der Identifikation einer minimalen Resterkrankung als auch in Abhängigkeit von der jeweiligen klinischen Bedeutung zur Prognoseeinschätzung und Risikostratifizierung dienen. Dies wiederum hat Einfluss auf die Entwicklung von Therapiestrategien und unterstreicht die zunehmende klinische Bedeutung, insbesondere für Patienten ohne zusätzliche zytogenetische Aberrationen.

molekularer Marker	Funktion Wildtyp-Protein / Resultat von Mutation	Häufigkeit der Mutation bei AML	Prognose
FLT3-ITD-Mutation Internal tandem duplikation	Tyrosinkinase-Rezeptor / konstitutive Aktivität	25 – 30%	schlecht Kottaridis 2001
FLT3-TKD (Tyrosinkinase-domäne-Mutationen)	Tyrosinkinase-Rezeptor / konstitutive Aktivität	7 – 8%	ungünstig bei Vorhandensein von FLT3-ITD und/oder MLL, Bacher 2008
NPM1-Mutation (Nucleophosmin-Mutationen)	Regulation der Gen-expression in Nukleoli	ca. 35%	günstig Schnittger 2005
C/EBP α -Mutationen	Transkriptionsfaktor / veränderte DNA-Bindung	ca. 8%	günstig Fröhling 2004
WT1 Mutation	Aktivierung Transkription, Unterdrückung Zelldifferenzierung	Ca 10%, bei normalem Karyotyp	ungünstig, Paschka 2008 Viprappane 2008 Gaidzik 2009
MLL – PTD (partielle Tandem-duplikation)	Inhibiert Methyltransferase	Ca 8% bei CN AML	schlecht Schnittger 2000 Caliguri 1998

Tab. 3: häufige Mutationen bei AML und deren klinische Bedeutung

2 Die AML bei älteren Patienten

2.1 Epidemiologie

Die AML bei älteren Patienten weist einige Besonderheiten auf. Neben der schon zuvor erwähnten steigenden Inzidenz der Erkrankung mit zunehmendem Lebensalter (18/100000 bei Personen > 65 Jahre vs. 1,8/100000 bei Personen < 65 Jahre) steigt auch der Anteil der

sekundären Erkrankungen an. In den USA sind etwa 40% der Patienten mit AML älter als 65 Jahre (Deschler und Lübbert 2006). Zusätzlich gibt es aber auch einen generellen Anstieg der Erkrankungszahlen, wie sich in einer kürzlich von Büchner et al. publizierten Arbeit zeigt. Nach Auswertung der Daten der AML Cooperative Group fand sich, dass 1981 25% der Patienten mit einer AML älter als 60 Jahre waren. Bis 1999 stieg der Anteil auf 51% (Büchner et al. 2009).

Dies mag zum einen mit der zunehmenden Zahl hämatologischer Vorerkrankungen insbesondere dem myelodysplastischen Syndrom, dessen Inzidenz sich ebenfalls mit steigendem Lebensalter erhöht, zusammenhängen. Zum anderen sind aber auch die steigenden Zahlen zytostatischer und strahlentherapeutischer Vortherapien im Rahmen der Behandlung anderer Malignome zu berücksichtigen.

De novo AML's bei älteren Patienten treten in nur ca. 5% auf. Weiterhin findet man bei Patienten, die älter als 56 Jahre sind, eine zunehmende Inzidenz prognostisch ungünstiger zytogenetischer Veränderungen (Deschler und Lübbert 2006).

Das Erreichen einer kompletten Remission und die 5 Jahres Überlebensrate sind auch bei älteren Patienten primär abhängig vom Karyotyp. Innerhalb der Prognosegruppen gibt es im Vergleich zwischen jüngeren und älteren Patienten bezüglich primärem Ansprechen und Erreichen einer kompletten Remission zunächst keinen Unterschied, jedoch sind 5 Jahres-Überlebensraten für ältere Patienten deutlich schlechter. Sie liegen bei Patienten unter 45 Jahren um 48 %, bei Patienten zwischen 45 und 65 Jahren bei 34% und bei Patienten über 65 Jahren bei 4,3%. (Deschler und Lübbert 2006).

Als weitere Faktoren hierfür werden die zwangsläufig mit ansteigendem Alter ebenfalls stark zunehmende Zahl und Schwere von Komorbiditäten und häufigere Überexpression des Multidrug-Resistenz-Gens 1 (MDR1) verantwortlich gemacht. Sie erschweren die notwendige intensive Chemotherapie durch zusätzliche Komplikationen, machen diese z. B. bei stark eingeschränkten Organfunktionen unmöglich oder führen durch die Überexpression des MDR1-Genes zur Steigerung der funktionellen Aktivität des Glykoprotein P mit der Folge eines gesteigerten Herauspumpens der therapeutischen Substanzen aus den Zellen und somit zu einem schlechteren Therapieansprechen (Stone et al. 2004). Eine eindeutige Beziehung zwischen Rezidivrate, rezidivfreiem Überleben und dem Nachweis von MDR1 bzw. Glycoprotein P konnte allerdings nicht gesichert werden (Leith et al. 1999).

2.2 Prognosefaktoren bei älteren AML-Patienten

Die oben genannten Aspekte der AML bei älteren Patienten haben dazu geführt, dass sich in den letzten Jahren zunehmend mehr Arbeiten mit der Herausarbeitung der Risikofaktoren in dieser Altersgruppe beschäftigt haben, um eine bessere Grundlage für Therapieentscheidungen zu erarbeiten.

In der Literatur übereinstimmend beschrieben, ist auch bei Patienten über 65 Jahre die Zytogenetik der erkrankten Zellen der führende Prognosefaktor (Grimwade 2001, Fröhling 2006). Als weitere wesentliche Faktoren zählen das Alter (Grimwade 2001, Fröhling 2006) und der Performancestatus des Patienten (Estey 2007, Kantarjian et al. 2006).

So wurde in einer Veröffentlichung von Estey aus dem Jahre 2007 der Einfluss von Performancestatus und Organfunktion auf das Erreichen einer kompletten Remission und die Frühmortalität herausgearbeitet. So sinkt die CR-Rate bei schlechtem Performancestatus oder schlechter Organfunktion auf ca. 27%, während die Frühmortalität bei bis zu 62% liegt. Bei gutem Performancestatus (≥ 3) und normaler Organfunktion erreichen immerhin 50% der Patienten eine komplette Remission während 17% innerhalb der ersten 8 Wochen sterben. Bei zusätzlicher Kombination mit einer günstigen Zytogenetik erhöht sich die Rate der erreichten Komplettremissionen auf 70% (Estey 2007).

Zusätzlich hierzu fanden Kantarjian et al., dass die Behandlung außerhalb eines Laminar Airflow Raumes, das Ausmaß der prätherapeutischen Anämie sowie des prätherapeutischen Kreatininwertes, eine länger als 6 Monate vorbestehende Blutbildveränderung sowie eine vorhergehende Chemotherapie unabhängige Risikofaktoren für das Erreichen einer kompletten Remission und das Gesamtüberleben sind. Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen dem Laktatdehydrogenasespiegel und Gesamtüberleben (Kantarjian et al., 2006) sowie zwischen β_2 -Mikroglobulin und Therapieansprechen (Estey 2008).

Als prognostisch ungünstig erwies sich bei älteren Patienten zudem eine Zeitverzögerung zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn (Estey 2007).

2.3 Therapie bei älteren Patienten

Prinzipiell stellt sich der therapeutische Ansatz bei älteren Patienten über 60 Jahre genauso wie bei den jüngeren Patienten dar. Jedoch sind unter Berücksichtigung der schon

aufgeführten Besonderheiten (zunehmende Inzidenz sekundärer Erkrankungen, gehäufte Inzidenz prognostisch ungünstiger zytogenetischer Veränderungen) das biologische Alter, der Performancestatus und bestehende Komorbiditäten als ursächlich für die insgesamt schlechtere Prognose älterer Patienten mit einer AML herausgearbeitet worden (Schaich und Ehninger 2006). Vorhandene Komorbiditäten und der Performancestatus haben einen entscheidenden Einfluss auf die Festlegung der Therapieintensität und somit des Therapieziels (kurativ vs. palliativ vs. supportiv). Aber auch bei gutem Performancestatus und fehlenden Komorbiditäten ist das Therapieansprechen schlechter (Estey 2006).

Die Standardtherapie besteht ebenso wie bei jüngeren Patienten in einem „3+7 Protokoll“, bestehend aus einem Anthrazyklin und Cytarabin. Jedoch werden nach Pulsoni et al. nur ca. 50 % der älteren Patienten einer intensiven Chemotherapie zugeführt (Pulsoni et al. 2004). Die medianen Überlebenszeiten variieren nach den Angaben aus der Literatur zwischen 2 und 15 Monaten.

Studien zur Therapieoptimierung konnten zeigen, dass eine Dosisreduktion von Cytarbin mit einer Verkürzung der medianen Überlebenszeit einhergeht, eine palliativ ausgerichtete niedrig dosierte Chemotherapie bei ansteigenden Leukozytenzahlen oder steigender Transfusionsfrequenz die mediane Überlebenszeit gar halbiert (Estey 2007). Hingegen scheinen ältere Patienten jedoch ebenfalls nicht von einer Therapieintensivierung zu profitieren (Büchner et al. 2009).

Weiterhin arbeitete Pulsoni heraus, dass Patienten, die älter als 70 Jahre sind, nicht von einer intensiven Chemotherapie profitieren. Das mediane Gesamtüberleben beträgt bei dieser Gruppe ca. 4 Monate unabhängig vom Therapieregime (Pulsoni et al. 2004).

3 Mutationen von Nukleophosmin (NPM1)

3.1 Struktur und Funktion von NPM1

NPM1 ist ein Phosphoprotein, welches hauptsächlich in der granulären Region der Nukleolen lokalisiert ist. Sein Molekulargewicht beträgt 35-40 kDa. Die genetische Information liegt im Exon 12 auf dem langen Arm des Chromosoms 5 (5q35). Neben NPM1 existieren zwei weitere Isoformen des Proteins: NPM 1.2 sowie NPM1.3. NPM1 ist die vorherrschende Isoform. Es besteht aus 294 Aminosäuren und befindet sich hauptsächlich in den Nukleoli.

Neben einer Vielzahl weiterer Aufgaben nimmt es auch eine wichtige Transportfunktion zwischen Zellkern und Zytoplasma wahr. Die verschiedenen Funktionen des Proteins werden über Oligomerisierungsprozesse, durch das Vorhandensein der unterschiedlichen Isoformen, Phosphorylierungen und die unterschiedlichen Lokalisation des Proteins in der Zelle erfüllt. NPM1 besitzt verschiedene funktionelle Domänen. Das N-terminale Ende des Proteins besteht zum einen aus einer hydrophoben Oligomerisierungsdomäne, die über Bindung mit Partnerproteinen insbesondere bei der Ribosomensynthese eine entscheidende Rolle spielt. Die mittlere Region ist sauer und trägt verschiedene Phosphorylierungsstellen. Sie hat Bedeutung für die Histonbindung, die Zentrosomenduplikation und die Zellzyklusregulation. Das C-terminale Ende ist mit seiner Basisregion beteiligt an der Bindung von Nukleinsäuren und an der Ribonukleaseaktivität. Ein der Basisregion folgendes aromatisches Stück ist wichtig für die Bindung an den Nukleolus (Lim und Wang 2006).

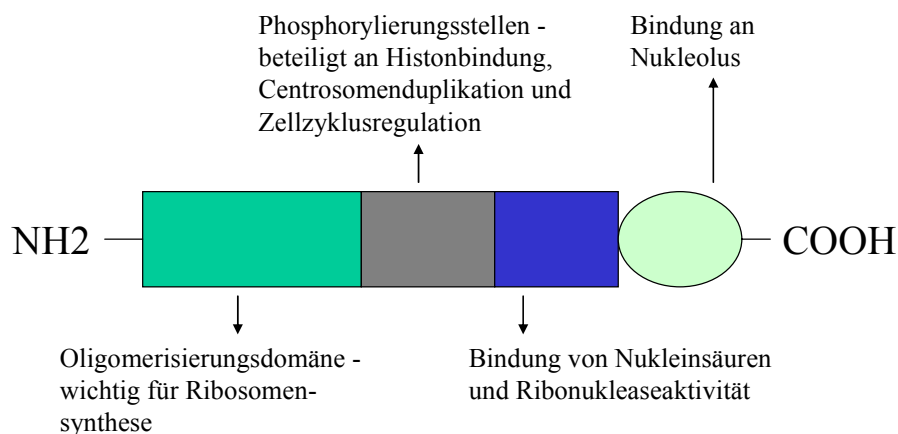


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Nukleophosmin

NPM 1.2 ist eine rein strangförmige Isoform, der im Vergleich zu NPM1 die letzten 35 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Genes fehlen. Es macht nur einen kleinen Anteil des gesamten Nukleophosmingehaltes aus. Über NPM1.3 ist bisher sehr wenig bekannt (Falini et al. 2007).

Nukleophosmin ist von entscheidender Bedeutung bei der Synthese ribosomaler RNA und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Proteinsynthese, dem Zellwachstum und der Zellproliferation. Über seine Funktion bei der Zentrosomenduplikation und den DNA-

Reparaturmechanismen ist es ebenfalls direkt beteiligt an der Regulation der Zellproliferation sowie vielfältigen anderen Prozessen zur Sicherung der Genomstabilität. Zusätzlich interagiert es mit dem Tumorsuppressorgen p53, dem p19ARF und deren Partnern. So ist es über die Blockade der ARF vermittelten p53-Aktivierung oder der p53-Stabilisierung über die Blockade der HDM2-p53 Formation entscheidend involviert in die Kontrollmechanismen der Zellproliferation und der Apoptose (Naoe et al. 2006, Falini et al 2007). In einer Arbeit von Wanzel et al. wird zusätzlich über das Zusammenwirken mit Miz-1 eine Bedeutung für die Induktion der Tumorsuppressorgene p15 und p21 beschrieben (Wanzel et al. 2008).

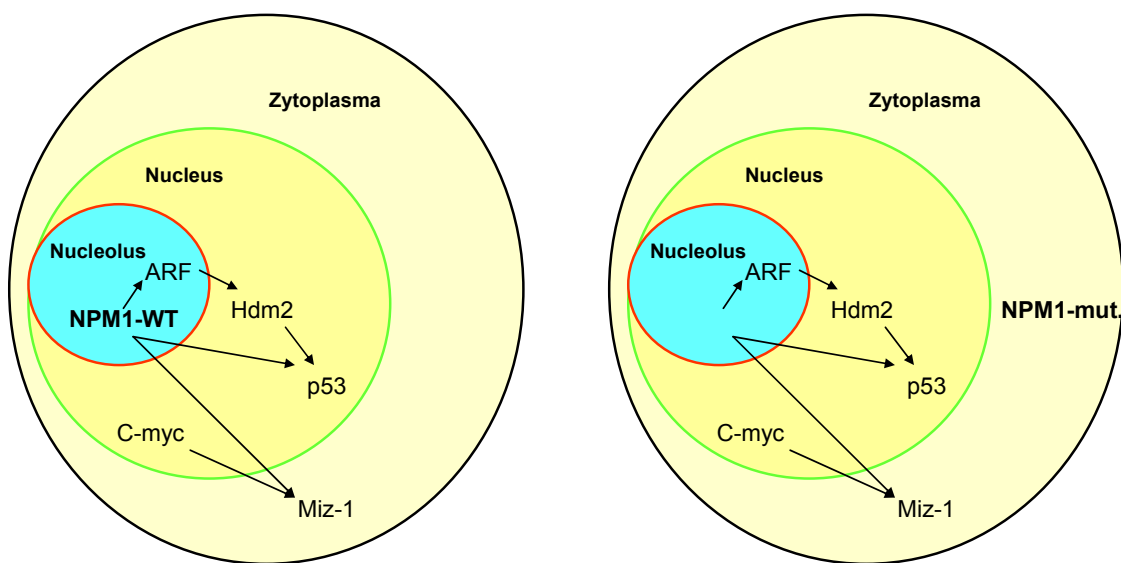


Abb. 2: Skizze der Pathobiochemie von NPM1

3.2 NPM1-Mutationen und deren klinische Bedeutung bei der AML

Die ersten Untersuchungen über mögliche Zusammenhänge zwischen NPM1 und AML erfolgten in Form immunhistologischer Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe um Falini et al. konnte auf diesem Weg zytoplasmatisch lokalisiertes Nukleophosmin in ca. 35% der untersuchten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nachweisen. Normalerweise befindet sich das Protein intranukleär. Nachfolgende Analysen zeigten schließlich die strenge Korrelation zwischen zytoplasmatischer Dislokation des Proteins und dem Vorliegen einer NPM1-Mutation, die letztendlich über den Verlust des nukleolären Lokalisationsignals zur Dislokation des Proteins in das Zytoplasma führt (Falini et al. 2007).

Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurde deutlich, dass NPM1-Mutationen vorwiegend Exon 12 betreffen und charakteristischerweise heterozygot sind (Falini et al. 2007). Es sind drei dominierende Mutationen bekannt. Mutation A mit einem Anteil von 75-80% der Fälle, Mutation B bei 10% und Mutation D bei 5% der Fälle. Alle 3 genannten Mutationen sind gekennzeichnet durch die Insertion von vier Basenpaaren an Position 956-959 mit der Folge eines veränderten Leserasters und deren Auswirkung auf die Aminosäuresynthese (Naoe et al. 2006).

Die Mutationen E und F sind gekennzeichnet durch den Verlust von fünf Nukleotiden an Position 965 bis 969, die durch zwei unterschiedliche je neun Basenpaare umfassende Sequenzen ersetzt werden (Falini et al. 2005). Inzwischen wurden mehr als 30 NPM-Mutationen nachgewiesen.

Die Angaben zum Vorkommen von NPM1 Mutationen in Bezug auf alle AML Patienten variieren zwischen 27,5% (Thiede et al 2006) und 35% (Falini et al. 2005). NPM1-Mutationen treten insbesondere bei Patienten mit einer de novo-Erkrankung und in Zusammenhang mit einem normalen Karyotyp auf. Ihr Anteil an diesen Fällen beträgt zwischen 45% (Thiede et al., 2006) und 50-60% (Falini et al. 2007). In einer größeren Untersuchungsreihe der Arbeitsgruppe um Falini konnten bei sekundären Erkrankungen keine NPM1-Mutationen nachgewiesen werden. Es fanden sich Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein einer NPM1-Mutationen und einem breiten Spektrum an morphologischen Subtypen, besonders häufig bei den Subgruppen M2, M5a und M5b nach FAB Klassifikation, seltener bei AML-M0, M4eo, M6 und M7, jedoch nicht bei der AML-M3 auf (Thiede et al. 2006). Weiterhin zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Nachweis einer NPM1-Mutation und einem normalen Karyotyp (45,7% aller NPM1 Mutationen (Thiede et al. 2006), einem Ansprechen auf die Induktionschemotherapie, der Abwesenheit von CD34 und CD 133 und in einem großen Maße mit dem Vorhandensein von FLT3 Mutationen. Auch eine höheren Mutationsrate des NPM1 bei weiblichen Patienten (33 versus 22% (Thiede et al. 2006) konnte nachgewiesen werden. Übereinstimmend wurde in einer Vielzahl von Arbeiten die positive prognostische Bedeutung von NPM1-Mutationen herausgearbeitet. So zeigen Patienten mit NPM1-Mutationen eine höhere Rate von kompletten Remissionen nach der Induktionschemotherapie (Schnittiger et al. 2005, Döhner et al. 2005, Falini et al. 2007, Thiede et al. 2006), ein längeres krankheitsfreies Überleben (ca. 20 versus 15 Monate), eine niedrigere Rezidivrate und ein höheres medianes Gesamtüberleben (ca. 16 Monate versus 12 Monate) (Thiede et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Döhner konnte des Weiteren demonstrieren, dass jüngere Patienten mit NPM1-Mutationen ohne FLT3-ITD-

Mutationsnachweis eine 5 Jahres-Überlebensrate von 60% haben und diese Patienten auch nicht von einer allogenen Stammzelltransplantation profitierten (Döhner et al. 2005).

In verschiedenen multivariaten Analysen o. g. Arbeiten wurde die NPM1-Mutation als positiver prädiktiver Marker für das Gesamtüberleben bei allen Patienten mit AML identifiziert. Bezogen auf Erkrankungen mit einem normalen Karyotyp fand sich diese Veränderung als unabhängiger günstiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben.

4 Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3

4.1 Struktur und Signalübertragung von FLT3

FLT3 ist ein Klasse III Tyrosinkinase Rezeptor und gehört zu der Familie der PDGF-Rezeptoren, welcher bei der Entstehung von Neoplasien eine bedeutende Rolle zukommt. Die genetische Information dieses 993 Aminosäuren umfassenden Proteins ist auf dem Chromosom 13 (13q12) lokalisiert und umfasst 24 Exons. Im normalen Knochenmark findet sich FLT3 auf der Zelloberfläche der frühen Formen der hämatopoetischen Progenitorzellen der myeloischen und der B-Zellreihe einschließlich der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen mit starker Ko-expression von CD117 (c-KIT) sowie auf den dendritischen Vorläuferzellen und ist an der Regulation der Zellteilung, der Differenzierung der Zellen sowie der Apoptose beteiligt (Lewis und Small 2003, Gilliland und Griffin 2002).

FLT3 wird bei einer Reihe maligner hämatologischer Erkrankungen sehr stark exprimiert. So konnte man FLT3 in 70 bis 100 Prozent der Fälle mit AML nachweisen. Ebenso findet es sich bei den B-Vorläufer-ALL's, einem Teil der T-ALL's und auch bei der CML mit lymphatischer Blastenkrise (Gilliland und Griffin 2002).

Die Struktur der Rezeptortyrosinkinasen aller ca. 20 bisher identifizierten Rezeptortyrosinkinasefamilien ist ähnlich. Neben der ligandenbindenden extrazellulären Domäne, einer transmembranären und juxtamembranären Domäne besitzen die Rezeptoren zudem ein oder zwei intrazelluläre Tyrosinkinasedomänen.

Klasse III-Rezeptoren liegen im Ruhezustand als Monomere vor (siehe Abbildung 2). Durch Bindung eines Liganden dimerisiert das Protein, wodurch die Tyrosinkinasedomäne aktiviert

wird, was schließlich zur Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase führt (Lewis und Small 2003).

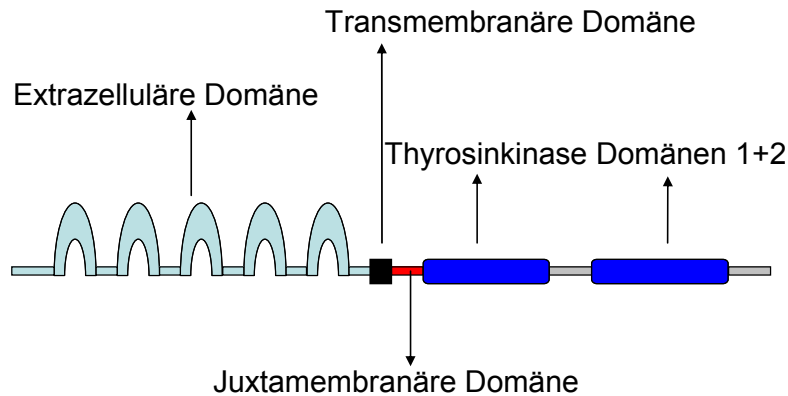


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus von FLT3 Tyrosinkinase

Der FLT-Ligand (FL) ist ein transmembranäres Protein, welches als lösliches Homodimer freigesetzt werden kann. Im Zusammenwirken von Zytokinen und Interleukinen ist der Ligand an der Induktion von Proliferation und Differenzierung der multipotenten Stammzellen sowie von lymphoiden Zellen beteiligt. FL wird von Zellen des Knochenmarks, wie den Fibroblasten als auch den myeloischen und lymphatischen Zelllinien exprimiert. Verschiedene Daten zeigen, dass die Stimulation von FLT3 durch FL die Proliferation und das Überleben von leukämischen Blasten induzieren und verbessern kann (Dehmel et al. 1996) und dass FL auch antiapoptotische Effekte auf myeloische Zelllinien zeigt (Drexler et al. 1999). Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass leukämische Zellen der B-ALL und AML häufig FL koexprimieren und so eine autokrine Signalschleife mit konsekutiver Aktivierung von FLT3 induzieren können (Small 2006).

Molekulare Veränderungen im FLT3-Gen können ebenfalls zu einer kontinuierlichen Aktivierung der Kinase mit folgender Phosphorylierung der Zielproteine ohne kompensatorische Gegenregulation führen (Lewis und Small 2003).

Die vielfältigen Signalwege, auf die die FLT3 Aktivierung Einfluss nimmt, sind bis dato nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist die Beteiligung an den RAS/MAPK den PI-3Kinase/AKT (Proteinkinase B)-Signalwegen sowie die Aktivierung des STAT5 Signalwegen (Small 2006). Weiterhin werden Einflüsse auf Gen-Regulation von PIM1, c-Myc und Cyclin D3 (CCND3) beschrieben (siehe Abbildung 3) (Li 2007).

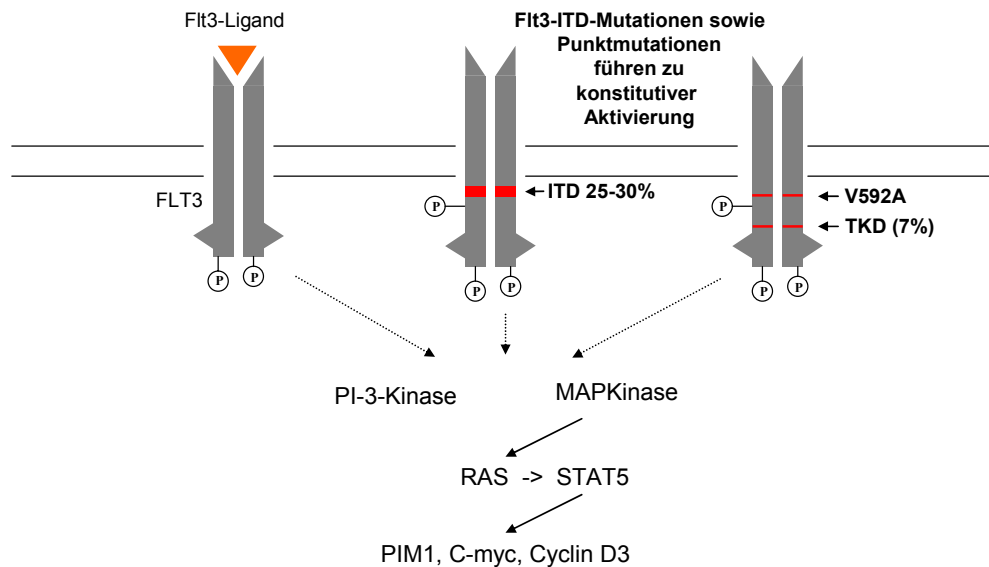


Abb. 4: Skizze der Pathobiochemie von FLT3

4.2 Bedeutung von FLT3-Mutationen bei AML

Für die AML spielen insbesondere zwei Formen der Rezeptoraktivierung eine Rolle. Dies sind zum einen die Internal Tandem Mutationen (FLT3-ITD-Mutation), die bei etwa 23-30% aller AML-Patienten nachgewiesen werden können (Nakao 1996) und zum anderen die FLT3 Tyrosinkinase Domänen Mutationen (FLT3-TKD-Mutation) mit einem Anteil 7-10% der AML's (Yamamoto 2001). FLT3-ITD-Mutationen sind charakterisiert durch duplizierte Sequenzen im Bereich des Exon 14, z. T. auch des Exon 15, im Bereich der juxtamembranären Region des Rezeptors, mit einer Länge zwischen 3 und z. T. über 400 bp (Levis und Small 2003, Schnittger et al. 2002a).

Die Inzidenz der FLT3-ITD-Mutation aller AML-Patienten wurde in großen Studien mit einem Anteil zwischen ca. 23 % (Thiede et al. 2002) und ca. 27 % (Kottaridis et al. 2001). herausgearbeitet. Die Prävalenz der FLT3-ITD Mutation steigt mit zunehmendem Alter von 10 – 15 % bei pädiatrischen AML-Patienten auf 25 – 35 % bei älteren Patienten (Nakao et al. 1996).

Der Anteil an Patienten mit AML und Nachweis eines normalen Karyotypes, bei denen ebenfalls eine FLT3-ITD-Mutation vorliegt, beträgt etwa 40 – 50 % (Thiede et al. 2002).

Die Inzidenz ist geringer bei Patienten mit sogenannten “core binding factor Translokationen“ (t(8;21) und inv(16) sowie mit ungünstigen zytogenetischen Abberationen (Lewis und Small 2003).

Zum Diagnosezeitpunkt zeigen viele der FLT3-ITD-positiven Patienten eine erhöhte Anzahl an Leukozyten und einen erhöhten absoluten sowie prozentualen Anteil an leukämischen Blasten im Knochenmark (Levis und Small 2003). Mehrere Studien konnten bei Patienten mit einer FLT3-ITD-Mutation eine Verringerung der Überlebenszeit und des krankheitsfreien Überlebens im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutation zeigen (Fröhling et al. 2002, Kottaridis et al. 2001).

In zwei Arbeiten von Kottaridis et al. (2001) und Rombouts et al. (2000) ließ sich aufzeigen, dass das Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation statistisch signifikant mit einem schlechteren Erreichen einer kompletten Remission einhergeht. Andere Untersuchungen konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Marczac et al. 2006, Boissel et al. 2005, Fröhling et al. 2002, Thiede et al. 2002).

Bei Patienten über 60 Jahren wurde in bisher zwei Studien zwar ein höherer Anteil an FLT3-Mutationen, jedoch ohne Beeinflussung der Prognose berichtet. Stirewalt et al. zeigten über verschiedene Analyseverfahren einen Anteil von

FLT3-ITD-Mutationen in 29 % (Elektrophorese) bis 34% (SSCP-Analyse) der Patienten mit AML ab 60Jahre. Verglichen mit Patienten ohne FLT3-ITD-Mutationen hatten die Patienten mit Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation signifikant höhere Leukozytenzahlen, höhere periphere Blastenzahlen sowie einen geringeren Anteil von CD34 positiven Blasten. Zusätzlich waren FLT3-ITD-Mutationen in der Gruppe der Patienten mit einer normalen Zytogenetik und somit einem intermediärem zytogenetischen Risiko zu einem höheren Anteil nachweisbar. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede beim Gesamtüberleben bzw. dem rezidivfreien Überleben (Stirewalt et al. 2001).

Weitere wichtige FLT3-Mutationen befinden sich im so genannten „activation loop“ der Tyrosinkinase 2 von FLT3. Diese Tyrosinkinasedomäne-Mutationen (TKD-Mutationen) sind meist Punktmutationen und betreffen sehr häufig den Aspartat-Rest an der Position 835 im Exon 20. Neben diesen Punktmutationen kann auch die Deletion eines Codons auftreten. Yamamoto et al. (2001) und Abu-Duhier et al. (2001) fanden eine Inzidenz dieser Mutation von ca. 7 % bei Patienten mit AML. In größeren Studien konnte diese Inzidenz bestätigt werden (Thiede et al. 2002, Fröhling et al. 2002).

Bisher sind eine ganze Reihe von FLT3-Mutationen entdeckt worden. Eine Übersicht hierzu ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

FLT3-TKD-Mutationen sind nach bisherigem Erkenntnisstand nicht mit einer initialen Leukozytose assoziiert. Sie treten meist unabhängig von FLT3-ITD-Mutationen auf und es fand sich in den meisten Studien kein signifikanter Einfluss der Mutation auf Remissionsraten oder Überleben und somit auf die Prognose der AML (Fröhling et al. 2002, Schnittger et al. 2002).

Mutation	Lokalisation (Exon)	Auswirkung	Häufigkeit	Referenz
FLT3-ITD	juxtamembranäre Region (JM) (14)	konstitutiv aktivierter Rezeptor	23 - 27 %	Nakao 1996
FLT3-TKD	activation loop (AL) (Kinasedomäne 2) (20)	konstitutiv aktivierter Rezeptor	ca. 7 %	Yamamoto 2001
FLT3-N841I und N841Y	AL (20)	konstitutiv aktivierter Rezeptor	ca. 5,7 %	Jiang 2004
FLT3-A680V	Kinasedomäne 1 (16)	nicht bekannt	3 %	Piccaluga 2003, Bianchini 2003
FLT3-V592A	JM (14)	konstitutiv aktivierter Rezeptor	ca. 0,7 %	Stirewalt 2004 (Spiekermann 2003)

Tab. 4: Darstellung der wichtigsten FLT3 Mutationen

III Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) im Alter über 60 Jahre retrospektiv auf das Vorhandensein verschiedener und bei jüngeren Patienten bereits als prognostisch bedeutsam identifizierten Mutationen untersucht werden. Bei den Patientenproben handelte es sich um im Rahmen der Routinediagnostik zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommenes Material (Knochenmark), welches primär für zytologische oder zytogenetische Untersuchungen isoliert wurde. Es sollten Proben von ca. 100 verschiedenen Patienten mit der Erstdiagnose einer AML auf FLT3-ITD-Mutationen sowie Nukleophosmin (NPM1) - Mutationen untersucht werden.

Bei den hier zu analysierenden FLT3-ITD-Mutationen handelt es sich um die häufigsten molekulargenetischen Veränderungen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 sowie zugleich um die bei jüngeren AML-Patienten häufigste Mutation, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Die NPM1-Mutationen hingegen repräsentieren die häufigste molekulargenetische Aberration bei jüngeren Patienten mit AML und sind bei Vorliegen eines normalen Karyotypes sowie Fehlen einer konkurrierenden FLT3-Mutation mit einer für diese Patientengruppe günstigeren Prognose vergesellschaftet. Die veränderte Signaltransduktion infolge der durch die interne Tandemduplikation vermittelten konstitutiven Aktivierung von FLT3 ist bereits sehr detailliert untersucht. Über die zellbiologischen Effekte von mutiertem NPM1 ist hingegen bislang nur wenig bekannt.

Es sollten in der vorliegenden Arbeit mittels etablierter molekularbiologischer Techniken Knochenmarkproben von neu diagnostizierten AML-Patienten hinsichtlich der beiden molekulargenetischen Veränderungen untersucht werden. Als methodische Grundlage diente jeweils die Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von aus den Proben isolierter genomischer DNA. Insbesondere zum Nachweis von NPM1-Mutationen erfolgte die Detektion des mutierten Allels mittels Fragmentanalyse.

Neben der molekularbiologischen Charakterisierung sollten wichtige klinische Daten (Art und Ansprechen auf verschiedene Therapieregimes) sowie relevante und im Rahmen der Diagnostik und Therapie der AML zwingend zu erhebende Standardlaborwerte einschließlich der initialen zytogenetischen Diagnostik erhoben werden.

In Kenntnis des Mutationsstatus für FLT3 und NPM1 der untersuchten AML-Patienten sollte nun genauer analysiert werden, inwieweit sich klinische Parameter in den einzelnen molekulargenetischen Subgruppen unterscheiden. Ein Schwerpunkt dieser Analysen bestand in der Untersuchung der prognostischen Bedeutung von FLT3-ITD- sowie von NPM1-

Mutationen für AML-Patienten über 60 Jahre. Die Datenlage für dieses Patientenkollektiv war mit Beginn der Arbeiten hinsichtlich der FLT3-ITD-Mutationen sehr spärlich und für NPM1-Mutationen bei älteren AML-Patienten praktisch nicht existent.

Weitere Analysen widmeten sich dem Einfluss verschiedener zytogenetischer Aberrationen in den Leukämiezellen auf die Prognose oder untersuchten Unterschiede im krankheitsfreien sowie Gesamtüberleben in Abhängigkeit von dem gewählten Therapieregime. Dabei wurden für die verschiedenen Therapieansätze (kurativ versus palliativ) separate Subgruppenanalysen entsprechend des vorliegenden Mutationsstatus durchgeführt. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag jedoch in der Untersuchung des Einflusses von FLT3-ITD- und NPM1-Mutationen auf die Prognose von AML-Patienten über 60 Jahre, welche mit kurativer Intention therapiert worden waren.

IV Patienten, Materialien und Methoden

A Patienten

1. Allgemeine Angaben

Es wurden insgesamt 99 Patienten mit der Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie, welche in der Klinik für Hämatologie/ Onkologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena diagnostiziert und behandelt wurden, in die Analyse eingeschlossen. Der Behandlungszeitraum lag zwischen 1999 und 2005. Das mediane Alter betrug 70 Jahre. 50,5% der Patienten waren weiblich, 49,5% Patienten männlich. Insgesamt fand sich in 63,3% eine de novo Form der Erkrankung, bei 35,7% der Patienten entwickelte sich die AML sekundär aus einem MDS bzw. als therapieassoziierte AML voraus gegangener Chemotherapie u. a. (eine Angabe fehlend). Es liegt ein positives Ethikvotum der Friedrich Schiller Universität für diese retrospektive, unizentrische Untersuchung vor.

	alle Patienten n=99
Geschlecht (m/ w)	48/ 51
Median Alter (Jahre, range)	71 (60-85)
Median Leukozyten (Gpt/l, range)	14,8 (0,4-321)
Median Hb (mmol/l, range)	5,4 (3,2-8,5)
Median Thrombozyten (Gpt/l, range)	55 (2-278)
Median PB Blasten (%, range)	27 (0-99)
Median KM Blasten (%, range)	71 (20-99)
Therapieansatz	
kurative Therapie	54
palliative Therapie	38
supportive Therapie	7

Tab. 5: Klinische Daten aller untersuchten Patienten

2. Therapie

Die Therapie der Patienten erfolgte entweder mit einem kurativen, palliativen oder supportiven Therapieansatz. Die kurative Behandlung erfolgte gemäß dem Studienprotokoll der Ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie (OSHO) aus dem Jahre 1997 für Patienten älter als 60 Jahre (AML97-Protokoll).

Alle Patienten, die nach dem AML 97 Protokoll der Ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie behandelt wurden, erhielten im Rahmen der Induktionschemotherapie Mitoxantron und Cytarabin: Mitoxantron $10\text{mg}/\text{m}^2$ an den Tagen 1 bis 3 und Cytarabin $2 \times 1\text{g}/\text{m}^2$ an den Tagen 1,3,5 und 7 im Abstand von 12 Stunden. Bei Nichterreichen einer kompletten Remission und Vorliegen einer partiellen Remission erfolgte eine Wiederholung der Induktionschemotherapie. Nach Erreichen der kompletten Remission wurden zwei Kurse einer konsolidierenden Chemotherapie mit Mitoxantron $10\text{mg}/\text{m}^2$ an den Tagen 1 und 2 und Cytarabin $2 \times 120\text{mg}/\text{m}^2$ an den Tagen 1 bis 5 angeschlossen.

Bei den palliativ therapierten Patienten kamen, je nach Allgemeinzustand, Komorbiditäten und individuellem Zustand des Patienten verschiedene Chemotherapieprotokolle zum Einsatz, so zum Beispiel niedrig dosiertes Cytarabin subkutan oder orale Therapien mit Thioguanin bzw. Idarubicin. Die supportive Therapie erfolgte ohne kausalen chemotherapeutischen Ansatz lediglich über die Behandlung von Infektionen, symptomatischen Zytopenien oder Begleit-erkrankungen. Insgesamt wurden 54,5% der Patienten kurativ, 38,4% der Patienten palliativ und 7,1% der Patienten supportiv behandelt.

3. Kriterien des Therapieansprechens

Eine komplette Remission der Erkrankung ist definiert durch folgende Merkmale:

- normale Knochenmarksverhältnisse mit Blasten unter 5% bei normaler Zellularität, normaler Megakaryopoese, mehr als 15% Erythropoese und mehr als 25% Granulopoese
- Normalisierung aller Blutwerte (keine Blasten, Thrombozyten über 100 Gpt/l und Granulozyten über $1,5\text{ Gpt/l}$)
- keine Hinweise auf extramedulläre leukämische Infiltrate
- über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen.

Eine partielle Remission liegt vor bei:

→ einer Verbesserung der hämatologischen Parameter im Blut und einem Blastenanteil von 6-25% Blasten im Knochenmark bei mindestens 10% Erythropoese und 25% normaler Granulopoese.

Bei Nichterreichen der Kriterien einer mindestens partiellen Remission liegt ein Therapieversagen vor.

Ein Rezidiv liegt vor, wenn nach einer erreichten kompletten Remission der Blastenanteil im Knochenmark und/oder im peripheren Blut erneut über 5% liegt.

B Statistische Analysen

1 Endpunkte

Das Gesamtüberleben ist definiert vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Tod. Als ereignisfreies Überleben wurde die Zeit zwischen Diagnosestellung und Auftreten eines Ereignisses (zum Beispiel Rezidiv, Tod, Therapieversagen) definiert.

Das krankheitsfreie Überleben beschreibt die Zeitpanne zwischen Erreichen der kompletten Remission und dem Auftreten eines Ereignisses.

2 Software

Für die statistische Analyse wurde das SPSS Software Paket 14 (SPSS, Chicago, IL) verwendet.

3 Verwendete statistische Tests

Die Leukozytenzahlen wurden mittels t -Test, die Überlebensunterschiede mit dem Log rank-Test verglichen, während die übrigen Variablen mittels χ^2 -Test verglichen wurden. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

C Materialien

1 Chemikalien

Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
Buffer EL (Erythrozyten-Lysepuffer)	Qiagen
Bromphenolblau	Roth
DMF	Roth
DNA-Marker	Gibco BRL
D-PBS	Gibco BRL
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FCS (fötales Kälberserum)	Invitrogen
IPTG	Qiagen
RPMI 1640	Invitrogen
SOC-Medium	Invitrogen
Sucrose	Roth
Trypton	Sigma
X-Gal	Qiagen

2 Enzyme

Eco RI	Roche Diagnostics GmbH
Taq-Polymerase	Gibco

3 Primer

Die für die Arbeit verwendeten Primer wurden bei der Firma TIBMolbiol aus Berlin erworben.

Name	Sequenz	Modifikation
NPM 1	5' – ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA – 3'	-
NPM 2	5' – GGC ATT TTG GAC AAC ACA TTC – 3'	-
NPM 1-Cy	5' – ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA – 3'	5'- Cy-5
NPM Seq	5' – CAC GGT AGG GAA AGT TCT CAC T – 3'	-
ITD 1	5' – CAA TTT AGG TAT GAA AGC C – 3'	-
ITD 2	5' – GTA CCT TTC AGC ATT TTG AC – 3'	-
M13forward	5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT– 3'	-
M13reverse	5' – GGA AAC AGC TAT GAC CAT G– 3'	-

Tab. 6: Verwendete Primer

4 Sonstige

EASYPREP Plasmid Miniprep Kit	Biozyme
QIAamp DNA Mini Kit (DNA Isolierung)	Qiagen
QIAquick PCR purification kit	Qiagen
System zur Fragmentanalyse	Beckman-Coulter
System zur Sequenzierung	Beckman-Coulter
TA-Klonierungssystem	Invitrogen

D Methoden

1 Zellkultivierung

OCI-AML3 ist eine humane akute Leukämiezelllinie, die als einzige von 79 untersuchten AML-Zelllinien als positiv hinsichtlich des Vorliegens einer Nukleophosmin-Mutation identifiziert wurde (Quentmeier et al. 2005). Die Zelllinie OCI-AML3 besitzt auf einem Allel eine Nukleophosmin-Mutation vom Subtyp A. Wir bezogen diese Zelllinie als auch die beiden Zelllinien THP-1 und MV4-11 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Während MV4-11 positiv für die Mutation FLT3-ITD ist, wurde die Zelllinie THP-1 sowohl in den Untersuchungen auf Nukleophosmin-Mutationen als auch hinsichtlich der Bestimmungen von FLT3-ITD-Mutationen als Negativkontrolle verwendet. Alle Zelllinien wurden mit RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FCS bei 37°C und 5 % CO₂, mit einer Dichte von 0,3 – 2,0 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert. Bei einer Verdopplungszeit von ca. 24 Stunden wurden die Zelllinien alle 3 bis 4 Tage 1 : 5 bis 1 : 7 gesplittet.

2 Molekularbiologie

2.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen. Dabei wurde das Untersuchungsmaterial (Knochenmarkproben von Patienten, OCI-AML3-, MV4-11- oder THP-1-Zellen) zunächst in 200 µl PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 20 µl Proteinase K-Lösung sowie 200 µl AL-Puffer dazugegeben und für 15 s gevortext. Das Gemisch wurde als nächstes für 10 min bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden nach kurzzeitiger Zentrifugation 200 µl Ethanol zugegeben, erneut 15 s gevortext und nochmals kurz zentrifugiert. Diese Lösung wurde nun auf eine Säule, welche sich auf einem 2 ml Sammelgefäß befand, gegeben. Danach wurde bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die isolierte DNA bindet nun an die Membran der Säule. Die Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gesetzt und danach mit 500 µl AW 1 Puffer beladen. Es wurde erneut bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert und anschließend ebenso mit 500 µl AW 2 Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule bei 14.000

rpm für 3 min zentrifugiert und anschließend auf ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und mit 50 - 200 µl sterilem Wasser beladen. Dies wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Elution der DNA wurde nochmals bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die DNA wurde dann bei -20°C gelagert.

2.2 PCR-Methoden und DNA-Elektrophorese

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von speziellen, gewünschten Nukleotissequenzen der DNA, die durch die Auswahl sogenannter Primer (kurze DNA Sequenzen von denen aus die Amplifikation startet) festgelegt werden. Die in einer PCR-Reaktion amplifizierte DNA kann mit der Elektrophorese sichtbar gemacht und somit weiter ausgewertet werden. In der DNA-Elektrophorese bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in dem angelegten elektrischen Feld vom negativen zum positiven Pol. Diese Wanderung wird durch ein sogenanntes Agarosegel je nach Größe der DNA-Moleküle unterschiedlich stark behindert, wobei große Moleküle entsprechend langsamer wandern als kleine Moleküle. Dem Agarosegel ist bereits der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert und durch UV-Licht (254 – 366 nm) zur Emission von Licht im roten Bereich (590 nm) angeregt werden kann. Die während der PCR amplifizierten DNA-Doppelstränge können so mit einer Kamera-Computereinheit detektiert und dokumentiert werden.

Die PCR-Produkte wurden jeweils mit 1%igen oder 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Hierzu wurden 1g oder 2 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer gelöst und solange in der Mikrowelle erwärmt bis die Flüssigkeit klar wurde. Das Gel wurde nun auf 50 – 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 µg/ml) pro 100 ml hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Nun wurde das Gel in die zuvor aufgebaute Apparatur gegossen und dann gewartet, bis das Gel bei Raumtemperatur erstarrte. Anschließend wurden der Kamm und die beiden Randbegrenzungen entfernt. Das Gel wurde nun in eine Gelkammer gestellt und mit TAE-Puffer überschichtet. 20 µl von jeder Probe wurden 1 : 5 mit 5fach Auftragspuffer vermischt und dann auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein 1 kb DNA-Längenstandard-Marker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 200 mA. Hierbei ermöglichte das im Auftragspuffers enthaltene Bromphenolblau eine Orientierung über die Lage der Lauffront.

TAE-Puffer (50fach):	Tris-Base	242	g
	Essigsäure	57,1	ml
	EDTA pH 8,0	100	ml
	H ₂ O	auf 1000	ml
Auftragspuffer (5fach):	Sucrose	40	% (w/v)
	EDTA	50	mM
	Bromphenolblau	0,001	% (w/v)

2.2.1 Untersuchung auf FLT3-ITD-Mutationen

Die aus den Patientenproben isolierte genomische DNA wurde mittels PCR in Anlehnung an die von Nakao publizierte Screeningmethode (Nakao et al. 1996) auf das Vorhandensein von FLT3-ITD-Mutationen untersucht. Hierfür wurde pro Ansatz wie folgt pipettiert.

genomische DNA (100 – 200 ng)	5	µl
dNTP's (je 0,25 mM)	1,5	µl
10x PCR Puffer	2,5	µl
Primer ITD 1 (10 µM)	1	µl
Primer ITD 2 (10 µM)	1	µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5	µl
H ₂ O	13,5	µl
Gesamt	25	µl

PCR-Programm:

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Synthese wurden zyklisch 35mal wiederholt.

primäre Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	92°C	30 s
Annealing	56°C	30 s
Extension	72°C	30 s
Adenylierung	72°C	5 min

Es wurden anschließend 20 µl des PCR-Produktes auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei bedeutet eine zusätzliche Bande oberhalb des dem Wildtyp zugehörigen PCR-Fragmentes das Vorhandensein eines FLT3-Allels mit einer zusätzlichen Insertion im Sinne einer FLT3-ITD-Mutation.

2.2.2 PCR zur Analyse von Nukleophosmin-Mutationen

Hierfür wurde die genomische DNA der Patientenproben durch PCR mit den Primerpaaren NPM 1-Cy5/ NPM 2 oder NPM 1/ NPM 2 amplifiziert. Es wurde pro Ansatz wie folgt pipettiert.

genomische DNA (100 – 200 ng)	5	µl
dNTP's (je 0,25 mM)	1,5	µl
10x PCR Puffer	2,5	µl
Primer NPM 1 oder	1	µl
Primer NPM 1-Cy5 (10 µM)		
Primer NPM 2 (10 µM)	1	µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5	µl
H ₂ O	13,5	µl
Gesamt	25	µl

PCR-Programm:

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Synthese wurden zyklisch 35mal wiederholt.

primäre Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	92°C	30 s
Annealing	58°C	30 s
Extension	72°C	30 s
Adenylierung	72°C	5 min

Von dieser PCR wurden nachfolgend entweder 20 µl des PCR-Produktes auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (nach Amplifikation des mit Cy5-markierten Primers NPM 1-Cy5) oder nach erneuter PCR mit den Primern NPM 1/ NPM 2 das PCR-Produkt über eine Säule aufgereinigt bzw. 2 µl des PCR-Produktes für die Klonierung eingesetzt (siehe unten).

2.3 Fragmentanalyse von Nukleophosmin-Mutationen

Nachdem mit dem Cy-5-markierten Primer die Region des Nucleophosmin-Gens amplifiziert wurde, in der die Mutationen zu erwarten sind, wurde ein Teil des PCR-Produktes wie beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dies diente zum einen zur Kontrolle der PCR-Reaktion selbst, zum anderen konnte so anhand des dokumentierten Gels eine visuelle Abschätzung der jeweiligen Produktmenge für jede PCR-Reaktion erfolgen. Diese semiquantitative Abschätzung war die Grundlage für die nachfolgende Vorverdünnung eines Teils der aus der PCR-Reaktion noch übrig gebliebenen 5 µl des PCR-Produktes.

Die PCR-Produkte wurden nach Ansetzen der beschriebenen Vorverdünnung auf einer 96well-Platte mit Sample-Loading-Solution (SLS; deionisiertes Formamid) in 30 µl SLS (vorgemischt mit einem fluoreszenzmarkierten Längenstandard) aufgenommen. Der Verdünnungsfaktor lag dabei zwischen 1:30 und 1:900, wobei Proben mit einem Verdünnungsfaktor von 1:30 nicht vorverdünnt wurden. Hier wurde 1 µl des unverdünnten PCR-Produktes direkt mit SLS gemischt. Als nächstes konnten die Proben auf eine CEQ-

Probenplatte aufgetragen werden (30 µl). Es wurde nachfolgend ein Tropfen Mineralöl in jedes well überschichtet. Die Platten wurden in das Analysegerät (CEQ3000, Coulter-Beckman) gestellt und ein Programm zur Fragmentanalyse gestartet. Die Analyse erfolgt dabei mittels Kapillargelelektrophorese, wobei durch Verwendung eines andersfarbigen Größenstandards eine exakte Größenbestimmung der mit dem Cy-5-markierten Primer amplifizierten PCR-Produkte erfolgen kann.

2.4. Klonierung und Sequenzierung

2.4.1 Klonierung von PCR-Fragmenten

Um die in den Fragmentanalysen erhaltenen Längenunterschiede der amplifizierten Region des Nukleophosmingens auch sicher dem Vorhandensein von Nukleophosmin-Mutationen (Insertion von jeweils vier Basenpaaren) zuordnen zu können, sollten die mit den Primern NPM 1 und NPM 2 erhaltenen PCR-Produkte sequenziert werden. Hierzu wurden diese PCR-Fragmente entweder zunächst kloniert oder nach Aufreinigung direkt für die Sequenzierung verwendet.

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das TA-Klonierungssystem von Invitrogen verwendet. Da die Amplifikation genomischer DNA mit den Primern NPM 1 und NPM 2 ohne sichtbare Nebenprodukte möglich war, konnten jeweils 2 µl des PCR-Produktes ohne vorherige Isolierung aus dem Agarosegel direkt in einen für die Replikation in *E. coli* geeigneten Vektor integriert werden (Ligation). Dieser Vektor wurde dann in einen *E. coli*-Stamm (kompetente Zellen) eingebracht. Nach dieser sogenannten Transformation erfolgte das Ausplattieren der Bakterien auf sogenannte Agarplatten, welche zuvor mit 40 µl X-Gal (Stammlösung 40 mg/ml in DMF) und 4 µl IPTG (Stammlösung 100 mM in Wasser) beschichtet wurden. Dies ermöglichte ein sogenanntes Blau-Weiss-Screening. Nach 16stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte sich das Beimpfen von Flüssigmedium mit Einzelkolonien (Klone). Für die Anzucht der isolierten Einzelkolonien wurde Medium mit 50 µg/ml Ampicillin verwendet. Die daraus isolierte Plasmid-DNA (amplifizierter Vektor) enthielt jeweils nur ein bestimmtes DNA-Fragment (Wildtyp oder Nucleophosmin-Mutation), welches bei der Ligation integriert wurde.

Der Plasmidvektor pCR II-TOPO von Invitrogen (TA-Cloning Kit) liegt linearisiert vor und hat u. a. folgende Eigenschaften:

- Singuläre 3'-Desoxythymidin-Überhänge. Diese sind für die Ligationseffizienz wichtig, da die Taq-Polymerase, die bei der PCR verwendet wird, in ihrer terminalen Transferaseaktivität singuläre Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR-Produktes heftet.
- Eine multiple Klonierungsstelle im Bereich des lacZ'-Gens. Dieses Gen kodiert für das α -Fragment der β -Galaktosidase, welches alleine keine β -Galaktosidaseaktivität besitzt. Verwendet man einen Bakterienstamm der das ω -Fragment der β -Galaktosidase (ebenfalls inaktiv) exprimiert, kann die Aktivität der β -Galaktosidase wieder hergestellt werden. Diese sogenannte α -Komplementation kann nur erfolgen, wenn keine Insertion eines DNA-Fragmentes in das Plasmid und somit die Expression des lacZ'-Genes erfolgt ist. Dies ist für das Blau-Weiss-Screening nötig: die aktive β -Galaktosidase spaltet X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Wenn das lacZ'-Gen durch Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen wird, bleiben nach Inkubation mit IPTG und X-Gal die Kolonien weiß, da keine aktive β -Galaktosidase gebildet werden kann.
- Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen (ausschließlich im Bereich der Klonierungsstelle)
- Bindungsstellen für M13-Primer im Randbereich der multiplen Klonierungsstelle zur Sequenzierung der Insertion.

Medien für die Bakterienkultur:

SOC-Medium:	2,0	% (w/v)	Trypton
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	10,0	mM	NaCl
	2,5	mM	KCL
	10,0	mM	MgCl ₂
	10,0	mM	MgSO ₄
	20,0	mM	Glucose
	pH	7,0	

LB-Medium:	1,0	% (w/v)	Trypton
	0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
	1,0	% (w/v)	NaCl
	pH	7,0	
LB-Agarplatten:	15	g/l	Agar
	50	µg/ml	Ampicillin

Zur Klonierung wurde der *E. coli* Stamm TOP 10F' verwendet. Er ist primär Ampicillin-sensibel und kann nur das ω -Fragment der β -Galaktosidase exprimieren (inaktiv). Bei diesem Stamm ist zusätzlich der lac-Repressor, welcher die Transkription des Genes blockiert, überaktiviert. Aus diesem Grund ist es notwendig, einen Induktor der lacZ'-Genexpression, wie z. B. IPTG zu verwenden.

2.4.2 Transformation

Hierfür erfolgte zunächst die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor mit folgendem Ligationsansatz (TOPO Cloning Reaktion):

PCR-Produkt	2	µl
Salzlösung unverdünnt	1	µl
H ₂ O	bis 5	µl
TOPO Vektor	1	µl
		<hr/>
		6 µl

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis gestellt. Es wurde nun je ein Aliquot mit kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut (One Shot TOP 10F'). Als nächstes wurden 2 µl der TOPO Cloning Reaktion dem Bakterienstamm zugegeben, vorsichtig gemischt und auf Eis belassen. Die eigentliche Transformation geschieht durch den nun folgenden sogenannten Hitzeschock. Dabei wurden die Zellen für genau 30 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzer Inkubation der Transformationsansätze auf Eis, erfolgte jeweils die Zugabe von 250 µl SOC-Medium. Danach wurden die Ansätze bei 37°C für 1 h auf einem Thermoschüttler

(225 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 50 – 100 µl von jeder Transformation ausplattiert. Die Agarplatten wurden für mindestens 18 h bei 37°C im Inkubator belassen. Am nächsten Tag wurden diese erst für 1 – 2 h bei 4°C belassen, bevor dann jeweils acht eindeutig weiße Kolonien in separate Falcon-Tubes mit je 4 – 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) überführt wurden. Die so isolierten Bakterienkolonien wurden anschließend 16 – 18 h im Bakterienschüttler bei 37°C inkubiert.

2.4.3 Plasmidpräparation

Hierzu wurde der EASYPREP Plasmid Miniprep Kit von Biozyme verwendet. Zunächst wurden der über Nacht dicht gewachsenen Bakterienkultur 1,8 ml entnommen und für 1 min zentrifugiert und der Überstand vollständig abgezogen. Das Pellet wurde nun in 50 µl Resuspensionspuffer vollständig gelöst. Anschließend wurden 100 µl Lyse- und 325 µl Neutralisationspuffer hinzu gegeben, wobei jeweils 2 s gevortext wurde. Das Gemisch wurde nun 1 min zentrifugiert und der Überstand in einen Filter überführt. Der Filter wurde zunächst in das alte Zentrifugengefäß gesetzt und für 30 s zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von 300 µl Waschpuffer und eine erneute Zentrifugation. Danach wurde der Filter in ein neues Gefäß gesetzt und mit 50 µl sterilem Wasser beladen. Zur Elution der isolierten Plasmide wurde nochmals für 30 s zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.4.4 Restriktionsanalyse der Plasmide

Die Restriktionsanalyse diente der Größenkontrolle der inserierten und klonierten DNA-Fragmente. Der Vektor besitzt Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. Für die Restriktionsanalyse wurde Eco RI eingesetzt, da der hier verwendete Vektor jeweils eine die Insertionsstelle flankierende EcoRI-Schnittstelle besitzt.

Die Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

Plasmid-DNA	10	µl
10x Puffer B	2	µl
H ₂ O	7	µl
Eco RI (10 U/µl)	0,5	µl
		<hr/>
	20	µl

Die Restriktionsansätze wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl zusammen mit 5x Auftragspuffer auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.4.5 Fragmentanalyse von Plasmiden

Die Restriktionsanalyse der Plasmide stellt lediglich eine Kontrolle bezüglich des Vorhandenseins eines inserierten PCR-Fragments dar. Das in den Vektor eingebrachte PCR-Produkt erfährt durch die klonale Selektion eine Auftrennung in Wildtypklone sowie solche Klone, welche gemäß der initialen Fragmentanalyse mutmaßlich eine Nucleophosmin-Mutation tragen. Eine zufällige Auswahl der Plasmide für die weitere Analyse mittels Sequenzierung könnte somit zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Es wurden daher zunächst jeweils vier Klone einer erneuten Fragmentanalyse unterzogen. Die Plasmide, welche dabei ein Fragment mit einer Größe von 324 bp enthielten konnten anschließend mittels Sequenzierung weiteruntersucht werden.

2.4.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen. Hierfür wurden zunächst 125 µl Buffer PB mit 25 µl PCR-Produkt gemischt und auf eine Säule gegeben. Für die Bindung der DNA wurde für 1 min mit 6000 rpm zentrifugiert. Fragmente mit einer Größe kleiner 100 bp werden dabei nicht an die Säulenmatrix gebunden. Somit ist es möglich, Primer und dNTP's von PCR-Produkten zu trennen. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen, wobei erneut für 1 min mit 6000 rpm zentrifugiert wurde. Nachdem der Durchfluss des ersten Waschschrittes verworfen wurde, erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nach Umsetzen der Säule auf ein neues Eppendorf-Tube wurden anschließend 30 µl steriles Wasser dazugegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde nochmals zentrifugiert und die Säule verworfen. Das Eluat wurde vor der weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.4.7 Sequenzierung nach SANGER

Für die Sequenzierung verschiedener Nucleophosmin-Mutationen wurde in der vorliegenden Arbeit das Sequenzierungssystem der Firma Beckman-Coulter verwendet. Als zu sequenzierende DNA wurde entweder die aus E. coli isolierte Plasmid-DNA oder das

aufgereingte PCR-Produkt der Amplifikation genomischer DNA mit den Primern NPM 1 und NPM 2 verwendet.

Die hier durchgeführte Sequenzierung nach Sanger ist eine enzymatische Sequenzierungsmethode und wird auch als „Kettenabbruchmethode“ bezeichnet. In der sogenannten Sequenzier-PCR zu einer linearen Amplifikation der zu sequenzierenden DNA. Der Reaktion sind normale Nukleotide (Desoxynukleosidtriphosphate, dNTP's) und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-nukleosidtriphosphate (ddNTP's) in einem bestimmten Verhältnis zugesetzt. Jedes der vier ddNTP's ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Diese „Kettenabbruch-ddNTP's“ besitzen keine 3' – Hydroxygruppe und führen nach Einbau in den neusynthetisierten DNA-Strang zu einem Ende der Synthesereaktion, da keine Verknüpfung mit hinzukommenden Nukleotiden möglich ist. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit dem entsprechenden ddNTP enden. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Fragmente mittels Elektrophorese. Mit Hilfe eines Lasers werden die DNA-Fragmente zur Fluoreszenz angeregt und können von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges an.

Sequenzier-PCR

Es wurden folgende Ansätze pipettiert:

Master Mix	8	μl
Plasmid-DNA oder aufgereinigtes PCR-Produkt	2	μl
Primer M13 forward (1,6 pmol/μl) oder Primer M13 reverse (1,6 pmol/μl) oder Primer NPM Seq	2	μl
H ₂ O	8	μl
	20	μl

PCR-Programm:

primäre Denaturierung	96°C	3 min
Denaturierung	96°C	20 s
Annealing	52°C	20 s
Synthese	60°C	4 min

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Synthese wurden zyklisch 29mal wiederholt.

Ethanolaufreinigung

Mit Beendigung der PCR wurden 5 µl Stopplösung sowie 60 µl 96 % Ethanol (-20°) zu jeder Probe hinzugegeben, um die DNA zu präzipitieren. Hierbei wurde jeweils gründlich gevortext.

Stopplösung:

3 M Natrium-Acetat	pH 5,2	40	µl
100 mM EDTA	pH 8,0	40	µl
Glycogen		20	µl

Die Proben wurden dann unverzüglich in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig von dem sichtbaren Pellet abgenommen. Danach wurde zweimal mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen (Entfernung von Salzurückständen), wobei das Pellet hierbei intakt bleiben sollte. Nun wurde 5 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand wieder vorsichtig abgenommen. Die Probe wurde nun bei niedriger Temperatur für 10 – 15 min im Speed-Vac-Vakuum getrocknet. Das Pellet musste vollständig getrocknet sein, bevor es in 30 µl Sample-Loading-Solution (SLS; deionisiertes Formamid) aufgenommen werden konnte. Danach wurden die Proben für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes konnten die Proben auf eine CEQ-Probenplatte aufgetragen werden (30 µl). Es wurden abschließend ein bis zwei Tropfen Mineralöl darüber gegeben. Die Platten wurden in das Sequenziergerät (CEQ3000, Coulter-Beckman) gestellt und das Sequenzierprogramm wurde gestartet.

3. Zytogenetische Analyse

Die Bestimmung des Karyotypes erfolgte bei der Diagnosestellung der AML mittels der üblichen zytogenetischen Standardmethoden durch das Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universitätsklinik Jena.

Die Stratifizierung der Risikogruppen (gute vs. intermediäre vs. schlechte Prognose) erfolgte in Anlehnung an eine Übersichtsarbeit von Estey und Döhner (2006).

V Ergebnisse

1. Ergebnisse experimenteller Teil

1.1 Nachweis von FLT3-ITD-Mutationen

Die Abbildung 5 demonstriert ein Beispiel des Nachweises von FLT3-ITD-Mutationen der hier untersuchten AML-Patienten.

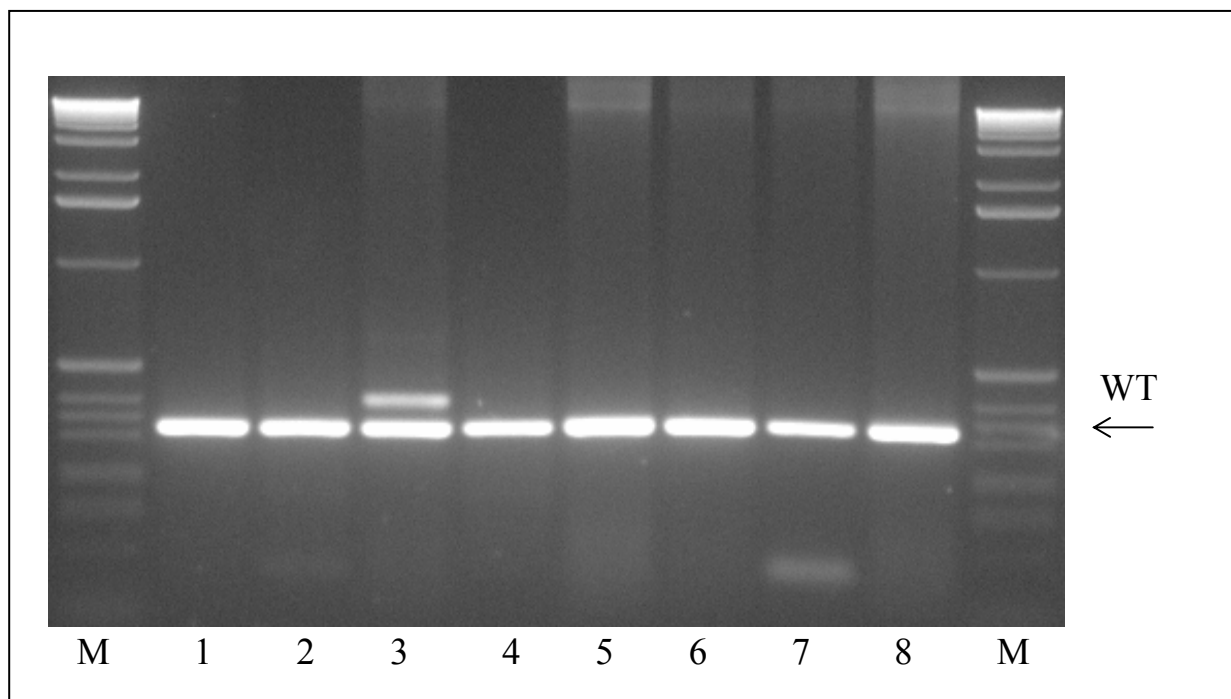


Abb. 5: Detektion von FLT3-ITD-Mutationen: Dargestellt ist die Analyse von Knochenmarkproben verschiedener AML-Patienten (1-8) mittels PCR und Gelelektrophorese (2% Agarose). Bei Patient #3 ist eine FLT3-ITD-Mutation nachweisbar (zusätzliches größeres Fragment), während die anderen Patienten ausschließlich Träger des Wildtyp-Allels sind. M – Marker zur Größenbestimmung der PCR-Produkte.

1.2 Nachweis von NPM1-Mutationen

In Abbildung 6 ist das Prinzip der Analyse von NPM1-Mutationen dargestellt. Hierbei erfolgte die qualitative Analyse mittels Fragmentanalyse nach PCR-Amplifikation unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Primers. Die Menge des in der Fragmentanalyse

eingesetzten PCR-Produktes richtete sich nach der Intensität des PCR-Produktes nach Auftrennung mittels konventioneller Agarose-Gelelektrophorese.

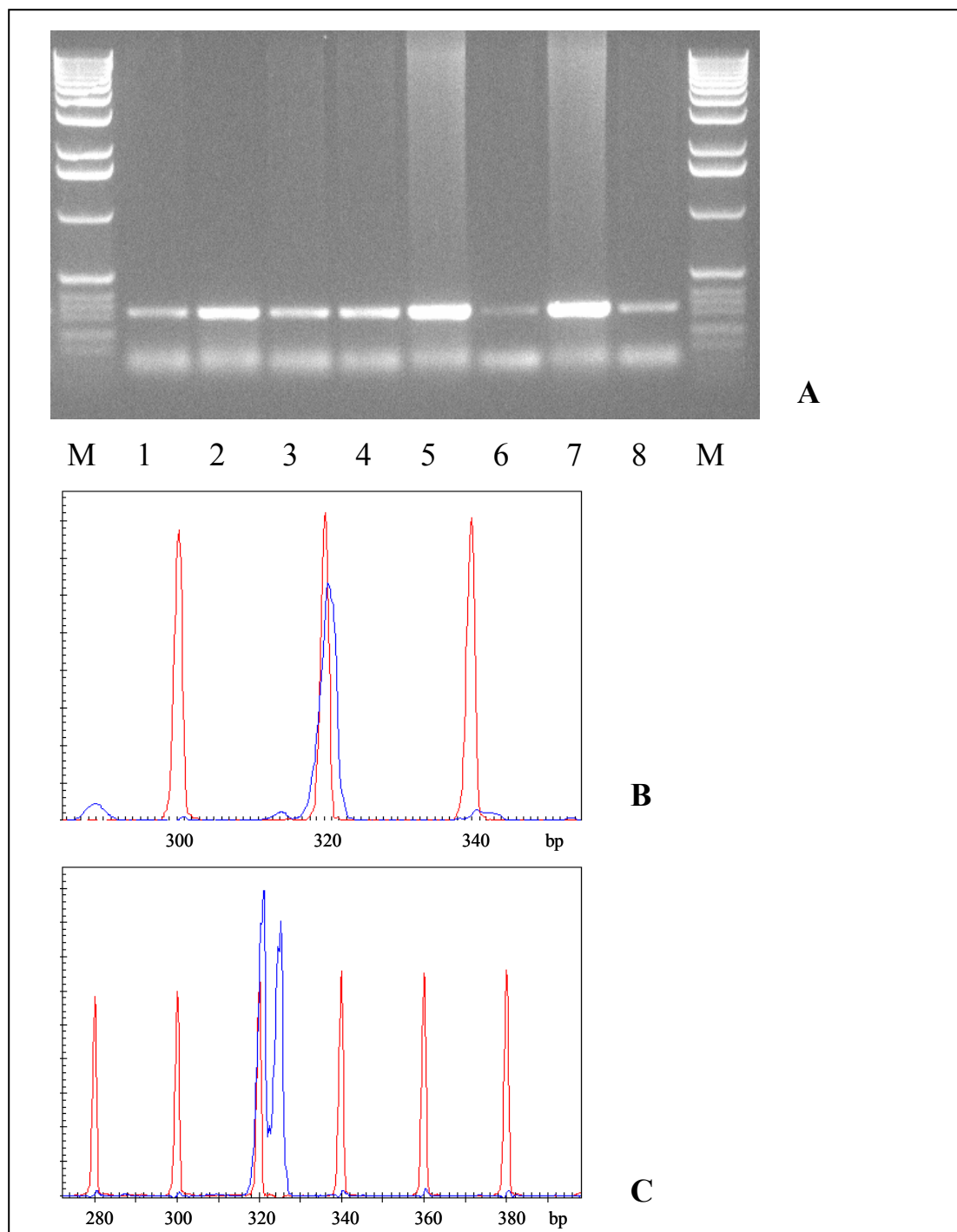


Abb. 6: Detektion von NPM1-Mutationen: Dargestellt sind die Gelelektrophorese (1% Agarose) der PCR-Produkte (A) zur Abschätzung der in der Fragmentanalyse einzusetzenden Menge. Beispiele für Fragmentanalysen (B - Wildtyp, C - NPM1-Mutation). Blau: fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt; rot: Längenstandard (alle 20 bp). Der zweigipflige Peak (C) demonstriert das Vorliegen des mutierten NPM1-Allels (Insertion von 4 bp).

1.3 Sequenzanalyse von NPM1-Mutationen

In Abbildung 7 ist die weiterführende Analyse von mittels Fragmentanalyse identifizierter NPM1-Mutationen mittels Sequenzierung dargestellt.

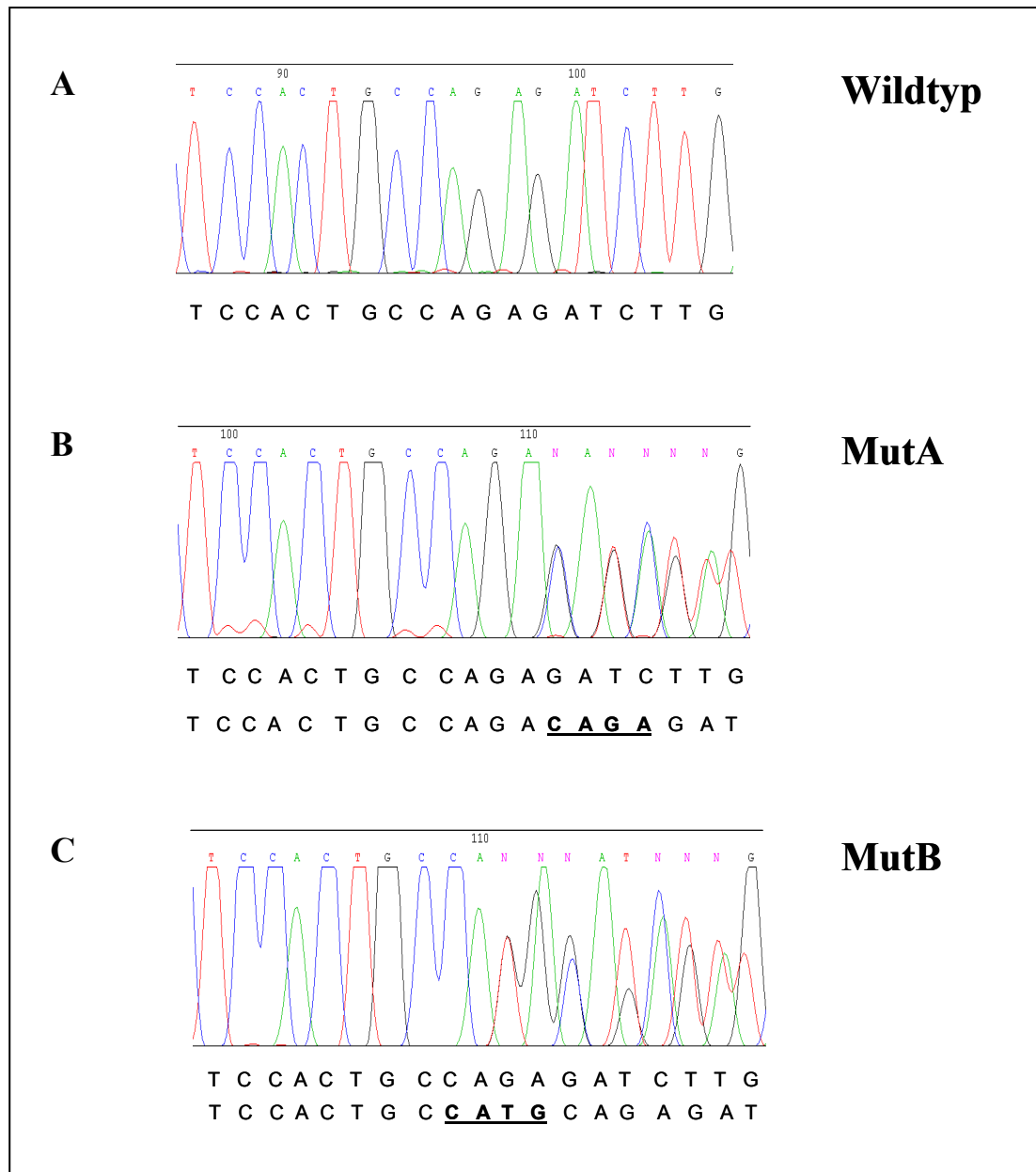


Abb. 7: Sequenzanalyse von NPM1-Mutationen: Dargestellt sind die Ergebnisse von direkt sequenzierten PCR-Produkten nach Amplifikation der korrespondierenden genomischen Region (Exon 12). A - Beispiel für Vorliegen von ausschließlich unmutierten Allelen (Wildtyp). B, C – Nachweis von jeweils einem mutierten Allel mit einer NPM1-Mutation in Exon 12 (Subtyp A vs. Subtyp B).

2. Klinische Daten und statistische Analysen

2.1 Patientencharakteristika

Die Charakteristika des Patientenkollektives sind in Tabelle 7 dargestellt.

	alle Patienten n=99	Wildtyp n=67	NPM1 - Mutation n=23	Flt3-ITD n=16
Geschlecht (m/ w)	48/ 51	36/ 31	6/ 17	6/ 10
Median Alter (Jahre, range)	71 (60-85)	70 (60-85)	75 (61-85)	75 (62-83)
Median Leukozyten (Gpt/l, range)	14,8 (0,4-321)	5,4 (0,4-162)	40,9 (1,3-127) P = 0,002	56,7 (1,4-321) P = 0,006
Median Hb (mmol/l, range)	5,4 (3,2-8,5)	5,4 (3,2-7,5)	5,4 (4,1-7,7)	5,7 (4,3-8,5)
Median Thrombozyten (Gpt/l, range)	55 (2-278)	56 (2-278)	55 (6-224)	54 (9-224)
Median PB Blasten (% , range)	27 (0-99)	21 (0-99)	45 (0-90) P = 0,012	72 (0-90) P = 0,0013
Median KM Blasten (% , range)	71 (20-99)	53 (20-99)	80 (20-99) P < 0,001	86 (66-99) P < 0,001
Therapieansatz				
kurative Therapie	54	37	13	7
palliative Therapie	38	25	10	7
supportive Therapie	7	5	0	2

Tab. 7 : Patientencharakteristiken Teil I – allgemeine Daten

Insgesamt wurden die Knochmarkproben von 99 Patienten mit einer AML untersucht, die 60 Jahre oder älter waren und in dem Zeitraum zwischen 1995 und 2006 in der Klinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Jena behandelt wurden. 48 Patienten waren weiblich, 51 männlich. Das mediane Alter lag bei 71 Jahren (Range von 60 -85 Jahre).

In 63% lag eine de novo-Erkrankung vor. Bei 36 % bestand ein vorausgehendes myelodysplastisches Syndrom. Eine normale Zytogenetik fand sich bei 31,1% der Patienten . Bei 20,2% der Patienten konnte keine zytogenetische Analyse vorgenommen werden.

Die mediane Leukozytenzahl war 14,8 Gpt/l, der mediane Hb betrug 5,4 mmol/l die mediane Thrombozytenzahl lag bei 55 Gpt/l.

Statistisch signifikant unterschieden sich die Leukozytenzahlen bei Patienten sowohl mit einer nachweisbaren NPM1-Mutation (5,4Gpt/l bei NPM1 negativen Patienten vs. 40,9 Gpt/l bei NPM1-positiven Patienten) ($p=0,002$), als auch mit einer nachweisbaren FLT3-ITD-Mutation (5,4 Gpt/l FLT3-ITD-negativ vs. 56,7 Gpt/l FLT3-ITD-positiv) ($p=0,006$) im Vergleich zu Patienten ohne Mutationsnachweis. Bezüglich des Blastenanteils lagen die Medianwerte bei 27% im peripheren Blut und im Knochenmark bei 71 %. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Patienten mit Mutationsnachweis im Vergleich zu den Patienten ohne genannte Mutationen. Sie lagen bei 53% (Wildtyp) vs. 80% (NPM1-positiv) bzw. 86% (FLT3-ITD-positiv) für das Knochenmark und 21% (Wildtyp) vs. 45% (NPM1-positiv) bzw. 86% (FLT3-ITD-positiv) für peripheres Blut. Auch unter Berücksichtigung der geringen Fallzahlen zeigte sich für die Korrelation zwischen den Blastenzahlen im Knochenmark und des Nachweis sowohl der NPM1-Mutation als auch der FLT3-ITD-Mutation eine hohe statistische Signifikanz mit $p < 0,001$. Ebenso konnte für den Zusammenhang von peripheren Blastenanteil und Mutationsnachweis sowohl für NPM1 als auch für die FLT3-IDT Mutation eine statistische Signifikanz belegt werden ($p=0,0013$).

Insgesamt wurden 55% ($n=54$) der Patienten mit einem kurativen Therapieansatz behandelt. 38% ($n=25$) der Patienten wurden palliativ therapiert und sieben (7%) erhielten eine rein supportive Behandlung.

2.2 Statistische Analysen

2.2.1 Klinischer Verlauf in Abhängigkeit vom Therapieregime

Von den insgesamt 54 kurativ behandelten Patienten erreichten 26 eine komplette Remission, von denen 24 ein Rezidiv erlitten. Drei dieser Patienten wurden einer Knochenmarktransplantation zugeführt, wobei einer der Patienten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes krankheitsfrei überlebte.

Insgesamt überlebten nur acht Patienten bis zum Abschluss der Datenerhebung, wobei für zwei weitere Patienten der Überlebensstatus nicht bekannt ist.

Die Gesamtüberlebenszeit betrug unter Berücksichtigung des Endpunktes der Datenerhebung im Median 203 Tage (Mittelwert 355 Tage) mit einer breiten Spannweite zwischen einem und 1776 Tagen. Aufgeteilt nach Therapieintention zeigte sich für den kurativen Therapieansatz ein medianes Überleben von 440 Tagen (Mittel 524 Tage), für die palliative Therapie ein medianes Überleben von 63 Tagen (Mittel 179 Tage). Patienten mit rein supportiver Therapie überlebten im Median 3 Tage.

In Abbildung 8 sind die Verläufe hinsichtlich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom angewandten Therapieregime graphisch dargestellt.

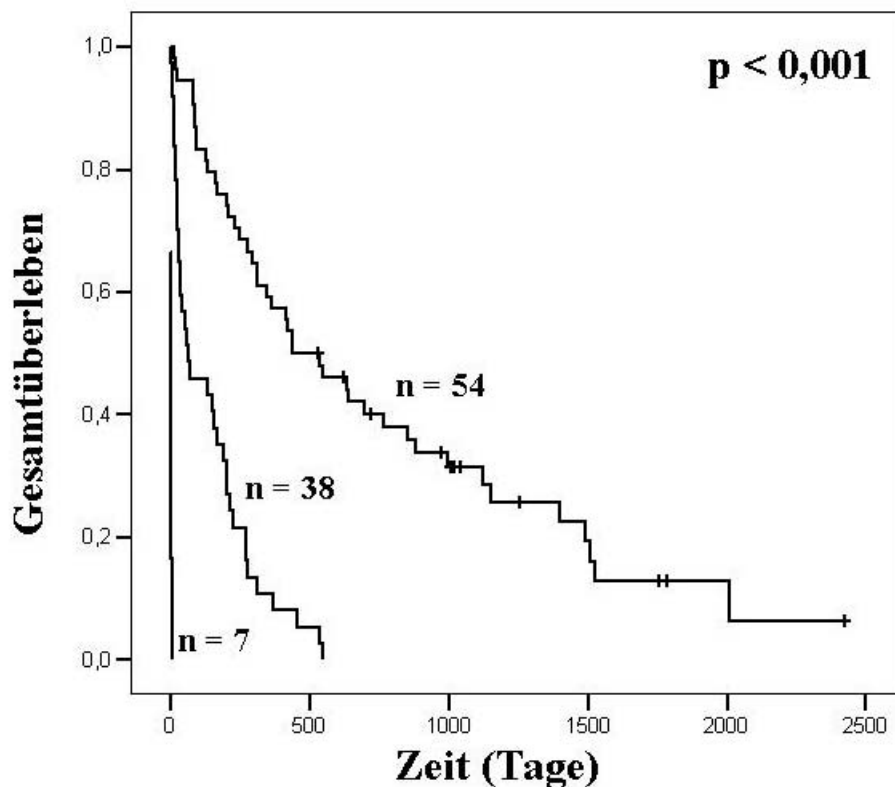


Abb. 8: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der angewandten Therapiemodalität (kurativ vs. palliativ vs. supportiv).

2.2.2 Klinischer Verlauf in Abhängigkeit von der Zytogenetik

Von den insgesamt 99 untersuchten Patienten lagen bei 80 Patienten die Daten der zytogenetischen Analyse vor. Die einfache Verteilung der Häufigkeiten in Bezug auf die Risikoeinschätzung durch die zytogenetische Analyse stellt sich wie folgt dar: bei 48 Patienten fanden sich Veränderungen, die mit einem normalen bzw. intermediären Risiko einhergehen. Lediglich drei Patienten zeigten prognostisch günstige zytogenetische Aberrationen, und bei 29 Patienten fanden sich Veränderungen, welche mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Für den Vergleich der Überlebenszeiten wurden die Risikogruppen „intermediär“ und „günstig“ wurden zu einer Gruppe der „nicht ungünstigen Aberrationen“ zusammengefasst.

Zytogenetische Risikogruppe	alle Patienten n=99	kurative Therapie n=54	palliative Therapie n=38	supportive Therapie n=7
„günstig“	3	3	0	0
„intermediär“ (XX/XY)	48 (31)	29 (17)	17 (14)	2 (0)
„ungünstig“ (komplex)	29 (22)	16 (11)	12 (10)	1 (1)
unbekannt	19	6	9	4

Tab. 8: Patientencharakteristiken Teil II - Patienten geordnet nach zytogenetischem Risikoprofil und Therapieansatz

Bei den kurativ behandelten Patienten ergab sich für die Gruppe der „nicht ungünstigen“ Veränderungen (Patienten mit günstigem sowie intermediärem Karyotyp) eine mediane Überlebenszeit von 851 Tagen im Gegensatz zu Patienten mit ungünstigem zytogenetischen Risiko von mit 276 Tagen.

Mittels Log Rank-Test bestätigt sich die Abhängigkeit zwischen dem Gesamtüberleben und dem zytogenetischen Risikoprofil als statistisch signifikant ($p = 0,029$). In Abb. 9 wird die Kaplan Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Bezug auf das zytogenetische Risikoprofil dargestellt.

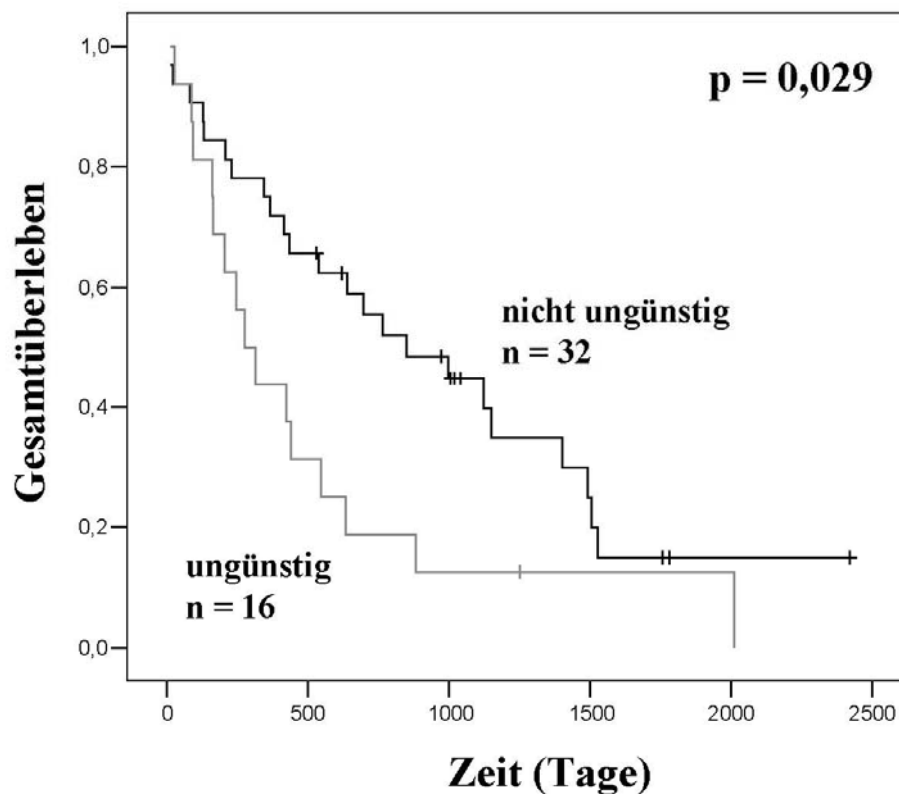


Abb. 9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der zytogenetischen Risikogruppe („nicht ungünstig“ vs. ungünstig)

Zusätzlich zeigte sich, dass von den kurativ behandelten, bis zum Ende der Datenerhebung überlebenden Patienten (n=10), ein Patient einen komplex aberranten Karyotyp aufwies, einmal fand sich ein günstiger Karyotyp, acht Patienten wiesen Veränderungen mit intermediärem zytogenetischen Risiko auf.

Der überlebende Patient mit dem komplex aberranten Karyotyp hat eine allogene periphere Blutstammzelltransplantation erhalten. Eine NPM1-Mutation bzw. eine FLT3-ITD-Mutation lagen bei ihm nicht vor.

In folgenden Abschnitten werden die prognostische Bedeutung der NPM1-Mutation sowie der FLT3-ITD-Mutation anhand der kurativ therapierten Patienten dargestellt.

2.2.3 Klinischer Verlauf in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Die durchgeführten Analysen erbrachten bei 16,5% der Patienten (n=16) den Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation. In 83,5% (n=83) fand sich keine FLT3-ITD-Mutation.

Bei der NPM1-Analyse konnte in 22,7% der Fälle (n=23) ein NPM1-Mutation nachgewiesen werden. Bei 77,3% (n=77) lag der Wildtyp vor.

In Tabelle 9 findet sich die Einteilung der Subgruppen bezüglich des Mutationsnachweises mit Aufgliederung nach Therapieansätzen.

Molekulare Subgruppe	alle Patienten n=99	kurative Therapie n=54	palliative Therapie n=38	supportive Therapie n=7
1 – NPM1-WT/ FLT3-WT	67	37	25	5
2 – NPM1-Mut/ FLT3-WT	16	10	6	0
3 – NPM1-WT/ FLT3-ITD	9	4	3	2
4 – NPM1-Mut/ FLT3-ITD	7	3	4	0

Tab. 9: Patientencharakteristiken Teil III – Aufteilung der Patienten nach molekularen Subgruppen und Therapieansatz

2.2.4 Ansprechraten auf die Therapie in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Die numerischen Werte der verschiedenen Kombinationen der Mutationsanalyse in Bezug auf das Erreichen einer kompletten Remission und die medianen Überlebenstage sind in Tabelle 8 dargestellt.

Hierbei zeigt sich deutlich, dass Patienten mit ausschließlichem Nachweis der FLT3-ITD-Mutation nur zu 25 % eine komplette Remission (CR) erreichen. Mit dem Erreichen einer kompletten Remission in 80% sind Patienten mit Nachweis einer NPM1-Mutation bei Fehlen einer FLT3-ITD-Mutation allen anderen Gruppen deutlich überlegen. Interessant ist, dass bei gleichzeitigem Auftreten einer NPM1- und einer FLT3-ITD-Mutation in 66% einer CR

erreicht wird und somit ein deutlicher Vorteil gegenüber der Gruppe ohne eine der beiden untersuchten Mutationen besteht. Den Zahlen liegen alle kurativ behandelten Fälle zu Grunde.

Molekulare Subgruppe	n	Überlebenstage (Median)	CR
1 – NPM1-WT/ Flt3-WT	37	440	15 (40,5%)
2 – NPM1-Mut/ Flt3-WT	10	1125	8 (80,0 %)
3 – NPM1-WT/ Flt3-ITD	4	58	1 (25,0%)
4 – NPM1-Mut/ Flt3-ITD	3	231	2 (66,7%)
Gesamt	54	486	26 (48,1%)

Tab. 10: Medianes Überleben und Ansprechraten bezogen auf die molekularen Subgruppen

2.2.5 Charakteristika der NPM1 positiven Fälle

Es konnten bei 23 der untersuchten 99 Patienten (23,2%) eine NPM1-Mutation nachgewiesen werden. Zwischen den Fällen mit mutiertem NPM1 und Fällen ohne NPM1-Mutations Nachweis fanden sich deutliche Unterschieden bezüglich der Leukozytenzahlen: 5,4 vs. 40,9 Gpt/l. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,002$). Ebenso statistisch signifikant unterschied sich der Blastenanteil sowohl im peripheren Blut (21% ohne NPM1-Mutations Nachweis vs. 45% mit NPM1-Mutation, $p=0,012$) als auch im Knochenmark (53% bei Patienten ohne bzw. 80% bei Patienten mit NPM1-Mutationsnachweis, $p=0,001$).

Bezüglich der initialen Thrombozytenzahlen und dem Hämoglobinwert zeigten sich keine Unterschiede zwischen Patienten mit NPM1-Mutation und ohne diese Mutation.

Insgesamt wurden von den 23 Patienten mit NPM1-Mutationsnachweis 13 Patienten kurativ behandelt, acht von diesen erreichten eine CR, ein Patient überlebte bis zum Ende der Datenerhebung. zehn Patienten wurden palliativ therapiert.

Die Verteilung des NPM1-Mutationstatus in Bezug auf die zytogenetische Risikogruppe ist in Tabelle 11 dargestellt.

Zytogenetische Risikogruppe	günstig	Normal/intermediär	schlecht
NPM1-Wildtyp	3	20	14
NPM1-Mutation	0	9	2

Tab. 11: Verteilung der NPM1-Mutation in den zytogenetischen Risikogruppen

2.2.6 Einfluss von NPM1-Mutationen auf krankheitsfreies sowie auf Gesamtüberleben.

Zur Frage der Unterschiede im krankheitsfreien Überleben und im Gesamtüberleben wurden die Patienten, bei denen ein Wildtyp nachgewiesen wurde ($n = 37$) (Gruppe 1) im Vergleich zu allen Patienten mit NPM1-Mutation ($n=13$) (Gruppe 2+4) mit kurativem Therapieansatz untersucht.

Hierbei ergaben sich für den Vergleich des Gesamtüberlebens zwischen Patienten ohne Mutationsnachweis und allen NPM1-positiven Patienten mit kurativem Behandlungsansatz deutliche Unterschiede (440 Tage vs. 884 Tage), welche jedoch nicht statistisch signifikant sind ($p=0,55$).

Das krankheitsfreie Überleben betrug ohne jegliche Mutation 523 Tage, mit NPM1 Mutationsnachweis 574 Tage ($p=0,81$).

Die Kaplan Meier-Analysen für diesen Vergleich sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Hier werden das Gesamtüberleben (Abb. 10) und das krankheitsfreie Überleben (Abb. 11) in Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer NPM1-Mutation abgebildet.

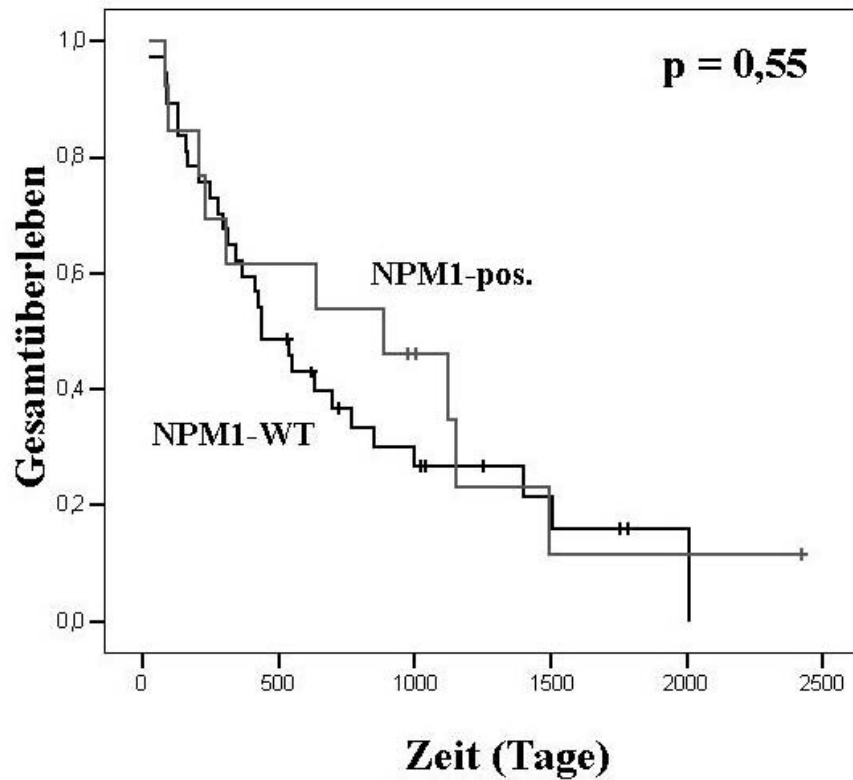


Abb. 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Nachweis einer NPM1-Mutation

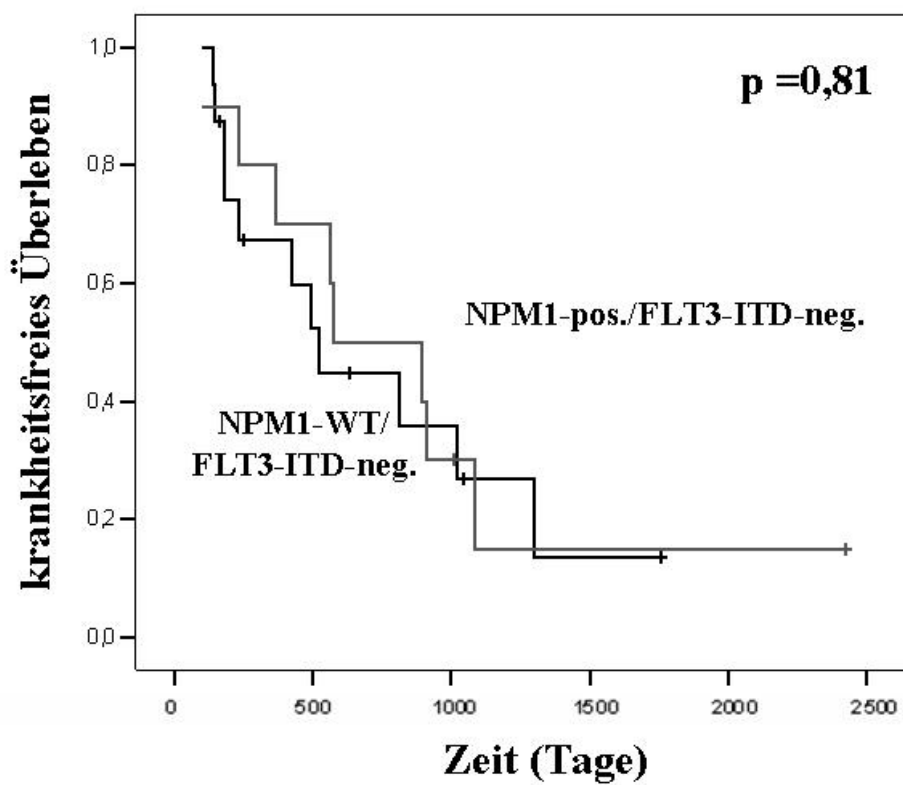


Abb. 11: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom NPM1-Mutationsstatus

2.2.7 Einfluss isolierter NPM1-Mutationen auf Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben

Um den Unterschied zwischen den NPM1-positiven und den NPM1-negativen Patienten unabhängig von dem Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation herauszuarbeiten, erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen 1 und 2. Das mediane krankheitsfreie Überleben unterschied sich bei den Absolutwerten erneut deutlich (523 vs. 895Tage), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,52$).

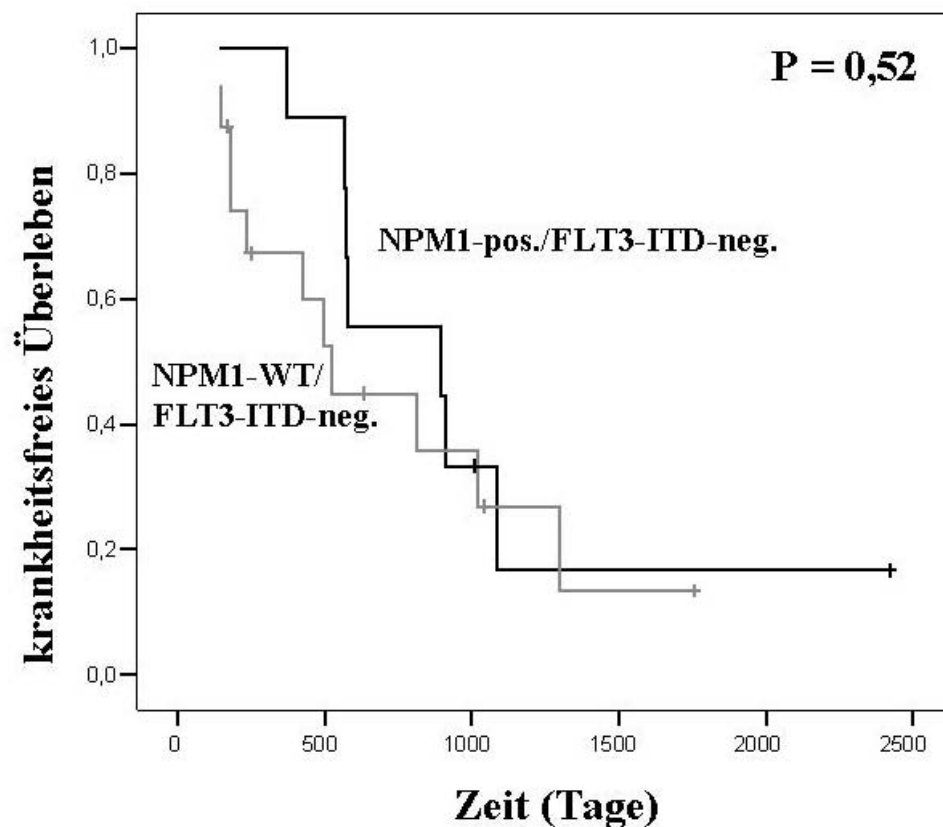


Abb. 12: Krankheitsfreies Überleben Gruppe 1 versus Gruppe 2 (NPM1-WT vs. NPM1-mutiert ohne FLT3-ITD)

Für das Gesamtüberleben aller kurativ behandelten Patienten (37 vs. 10 Patienten) ergaben sich noch deutlichere Unterschiede bei den Absolutwerten der Überlebenstage (medianes Überleben 440 vs. 1125 Tage), jedoch konnte auch hierbei die statistische Signifikanz nicht belegt werden ($p=0,22$).

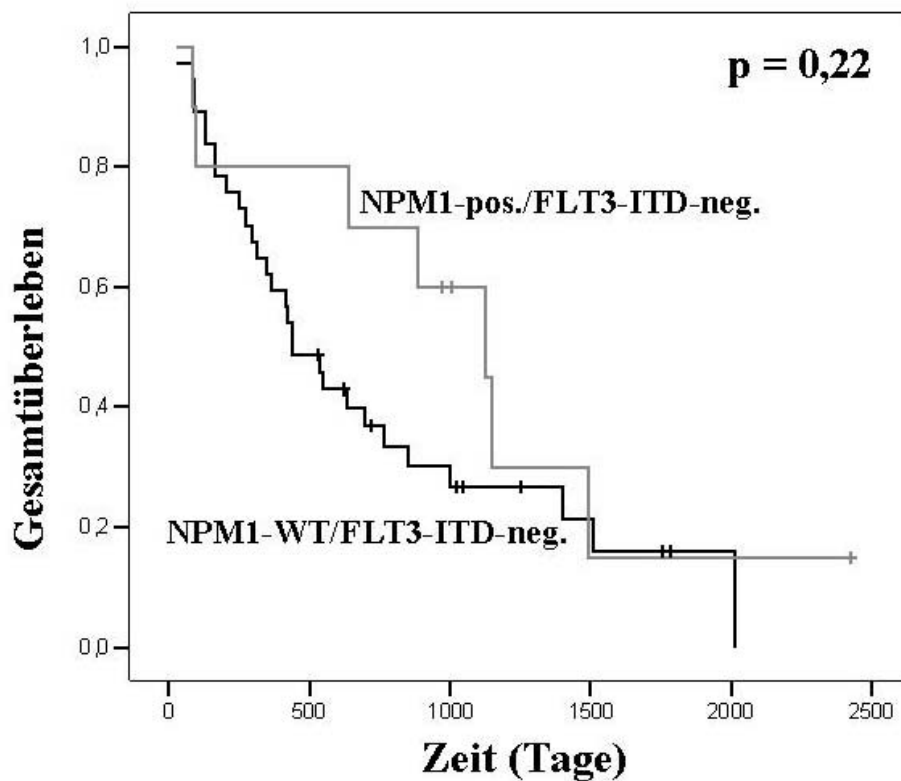


Abb. 13: Gesamtüberleben Gruppe 1 versus Gruppe 2 (NPM1-mutiert vs. NPM1 WT ohne FLT3-ITD)

2.2.8 Charakteristika aller FLT3-positiven Fälle

Von den 99 Patienten konnte bei 16 (ca.16%) eine FLT3-ITD-Mutation nachgewiesen werden.

Ebenso wie bei den Patienten mit dem Nachweis einer NPM1-Mutation fanden sich bei den Patienten mit Nachweis einer FLT3-ITD Mutation zum Diagnosezeitpunkt deutlich erhöhte Leukozytenzahlen (median 56,7 Gpt/l) im Gegensatz zu den Patienten ohne FLT3-ITD Nachweis (median 5,4 Gpt/l). Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,006$). Ebenso statistisch signifikant unterschied sich der Blastenanteil sowohl im peripheren Blut (21Gpt/l ohne FLT3-ITD Nachweis vs. 72% mit FLT3-ITD Nachweis, $p=0,013$) als auch

im Knochenmark (53% bei Patienten mit bzw. 86% bei Patienten ohne FLT3-ITD Nachweis, $p=0,001$).

Keine Unterschiede erbrachte der Vergleich zwischen den initialen Thrombozytenzahlen sowie dem Hämoglobinwert zwischen Patienten mit FLT3-ITD-Mutation bzw. Patienten mit Vorliegen eines FLT3-Wildtyps.

Insgesamt wurden von den 16 Patienten mit FLT3-ITD-Nachweis sieben Patienten kurativ behandelt, drei von ihnen erreichten eine komplette Remission, keiner der Patienten überlebte bis zum Ende der Datenerhebung. Sieben Patienten wurden palliativ therapiert.

Eine Übersicht über den Zusammenhang zwischen zytogenetischem Risikoprofil und FLT3-Mutationsstatus wird durch Tabelle 12 gegeben.

Zytogenetische Risikogruppe	günstig	intermediär	schlecht
FLT3-Wildtyp	3	24	16
FLT3-ITD	0	5	0

Tab. 12: Verteilung des FLT3-Mutationstatus in Bezug auf die zytogenetischen Risikogruppen

Eine Analyse des Zusammenhanges zwischen dem Vorhandensein einer FLT3-Mutation und zytogenetischen Risiko ist nicht möglich, da die FLT3-ITD-positiven Patienten ausschließlich ein intermediäres zytogenetisches Risikoprofil aufweisen.

2.2.9 Einfluss der FLT3-ITD-Mutation auf krankheitsfreies und Gesamtüberleben

Bei dem Vergleich aller FLT3-ITD positiven Patienten ($n=7$) mit den Patienten ohne Mutationsnachweis ($n=47$) (Gruppe 1 plus 2 versus Gruppe 3 plus 4) mit kurativem Therapieansatz ergab sich eine deutliche Differenz bei der Beurteilung des krankheitsfreien Überlebens im Vergleich beider Gruppen. Die medianen krankheitsfreien Tage lagen bei 810 Tagen bei Patienten ohne Mutationsnachweis und bei 233 Tagen für Patienten mit Mutationsnachweis. Das Signifikanzniveau wird mit $p=0,06$ knapp verfehlt.

Für das mediane Gesamtüberleben beider Patientengruppen ergaben sich 634 vs. 210 Tage, woraus sich ein p -Wert von 0,03 errechnet. Der Unterschied ist somit signifikant.

Die Kaplan Meier-Analysen für diesen Vergleich sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

In Abbildung 14 ist das krankheitsfreie Überleben in Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation dargestellt, in Abbildung 15 erfolgt die graphische Darstellung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation.

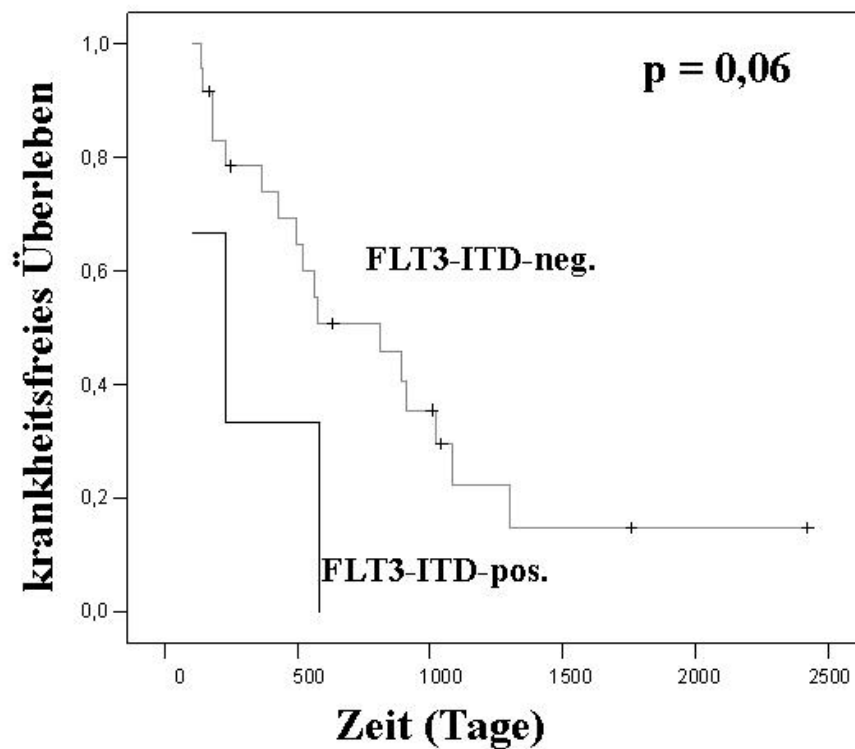


Abb.14: Krankheitsfreies Überleben Gruppe 1 plus 2 (alle FLT3-ITD-negativen Patienten) versus Gruppe 3 plus 4 (alle FLT3-ITD-positiven Patienten)

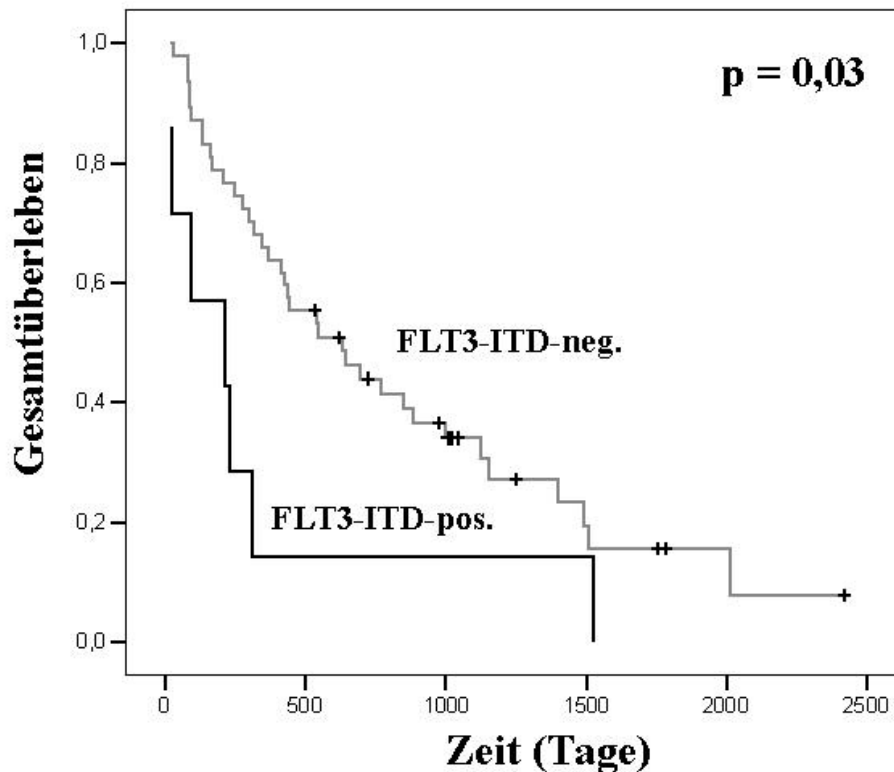


Abb. 15: Gesamtüberleben Gruppe 1 plus 2 (alle FLT3-ITD-negativen Patienten) versus Gruppe 3 plus 4 (alle FLT3-ITD-positiven Patienten)

2.2.10 Weitere Subgruppenanalysen

Der Vergleich zwischen allen NPM1-positiven Fällen mit Negativität für FLT3-ITD und allen FLT3-ITD-positiven Fällen zeigt für das Gesamtüberleben unter kurativer Behandlungsintention einen deutlichen Unterschied bei den Medianwerten (1125 Tage vs. 210 Tage), das Signifikanzniveau wird mit 0,08 jedoch auch hier knapp verfehlt.

Auch bezüglich des krankheitsfreien Überlebens zeigen sich deutliche Unterschiede (574 vs. 233 Tage). Der Unterschied ist allerdings ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,17$).

2.2.11 Analyse aller palliativ therapierten Patienten

Eine gesonderte Analyse aller palliativ therapierten Patienten zeigt einen möglichen Überlebensvorteil für die Patienten ohne Nachweis einer Mutation, wie durch die medianen Überlebenszeiten in Tabelle 13 gezeigt wird.

Molekulare Subgruppe	n	Mediane Überlebenszeit (Tage)
1 - NPM-WT/ Flt3-WT	24	73
2 - NPM-Mut/ Flt3-WT	6	38
3 - NPM-WT/ Flt3-ITD	3	27
4 - NPM-Mut/ Flt3-ITD	4	37

Tab 13: Überlebenszeit aller palliativ therapierten Patienten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Hierbei wird noch einmal deutlich, dass die mediane Überlebenszeit bei allen palliativ therapierten Patienten deutlich unter der Überlebenszeit der kurativ therapierten Patienten liegt.

Abweichend zu den Daten bei den kurativ therapierten Patienten zeigt sich das deutlich längste mediane Überleben bei der Gruppe der Patienten, die weder eine NPM1-Mutation noch eine FLT3-ITD-Mutation aufweisen. Zudem ergibt sich ebenfalls divergent zu den kurativ therapierten keine Prognoseverbesserung aus dem kombinierten Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation und einer NPM1-Mutation

Die Zusammenhänge lassen sich lediglich deskriptiv darstellen. Eine statistische Signifikanz besteht nicht.

In den Abbildungen 16-18 sind die wichtigsten Vergleiche zwischen den molekularen Untergruppen der palliativ therapierten Patienten graphisch dargestellt.

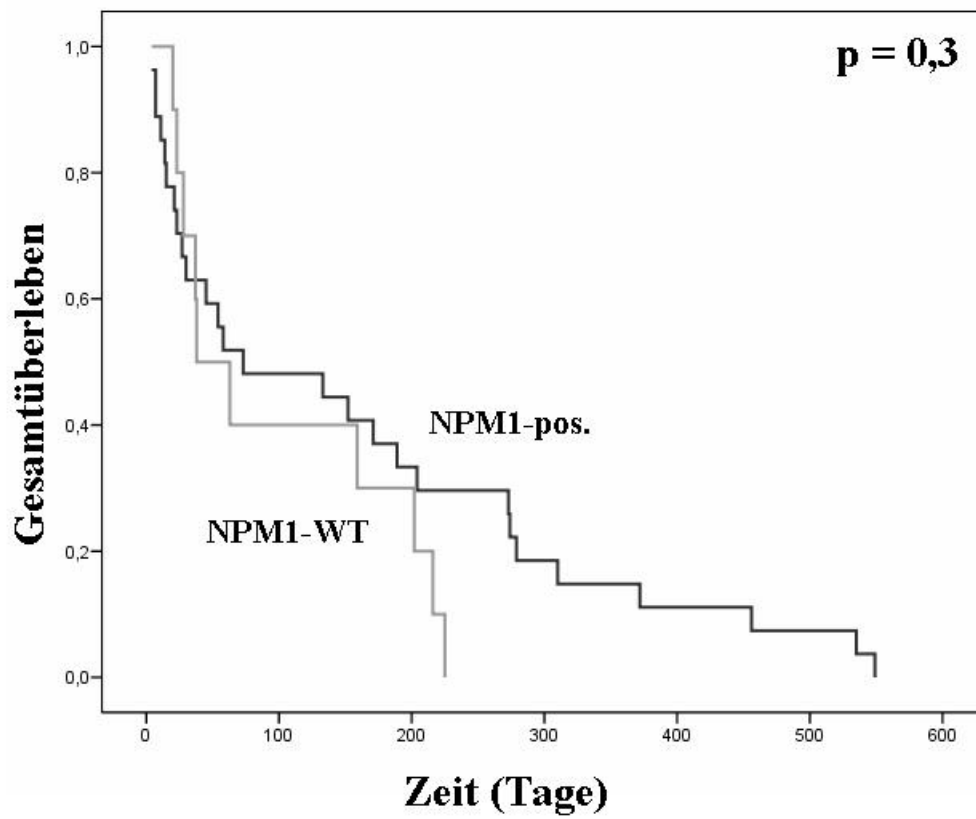


Abb. 16: Vergleich zwischen Patienten mit bzw. ohne NPM1-Mutation (palliativ)

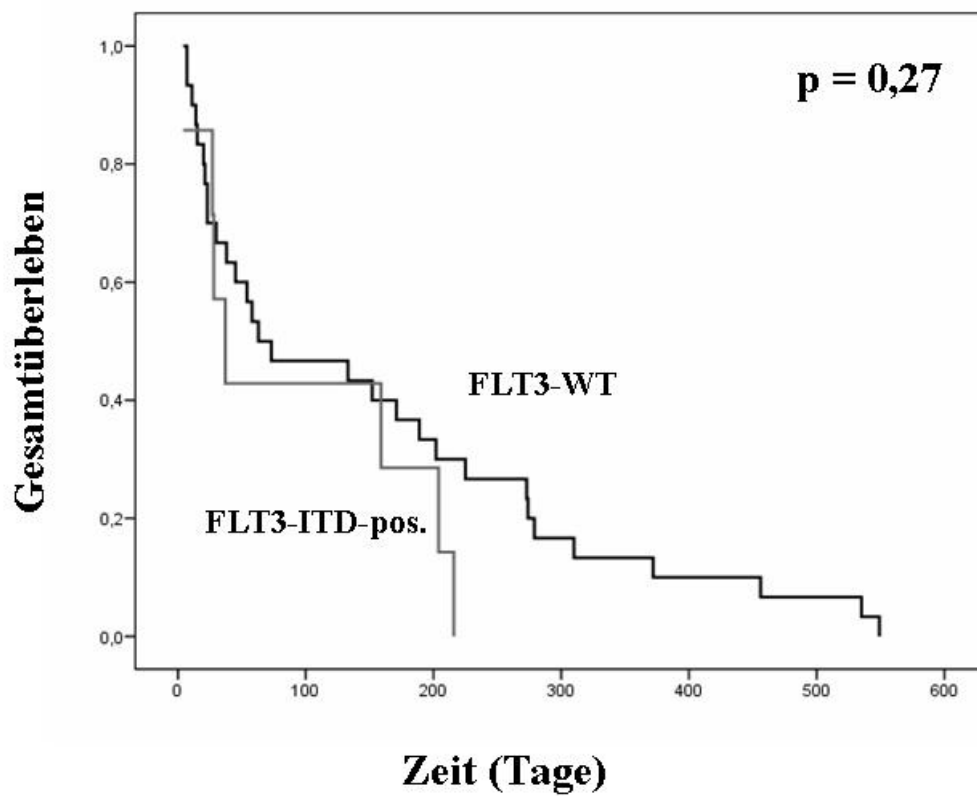


Abb. 17: Vergleich zwischen Patienten mit FLT3-ITD-Mutation bzw. FLT3-WT (palliativ)

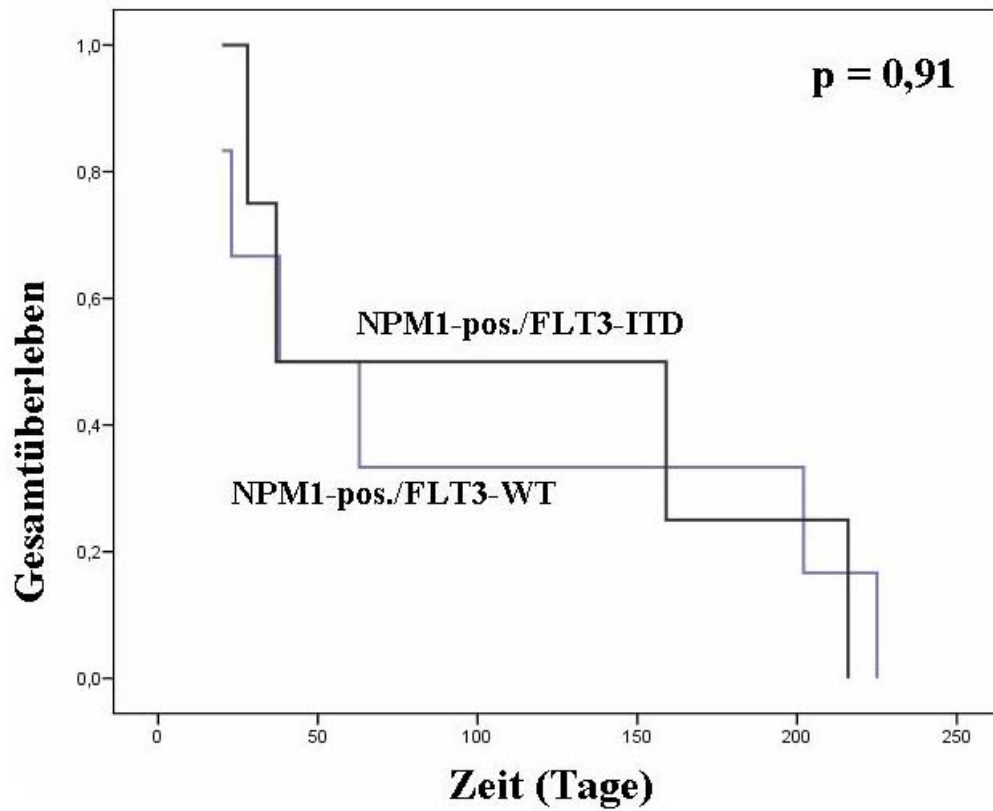


Abb. 18: Analyse der NPM1-positiven Patienten in Abhängigkeit zusätzlichen Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation bzw. ohne (palliativ)

VI Diskussion

Die Datenerhebung für die Analyse der Patienten erfolgte retrospektiv und unizentrisch. Der Anteil der unter kurativer Intention therapierten Patienten betrug 54%. Insgesamt wurden nur sieben Patienten supportiv therapiert. Die Einordnung in die Therapiegruppen erfolgte anhand klinischer Parameter und unter Berücksichtigung der Kontraindikationen, die im OSO-Protokoll (AML97-Protokoll) angegeben wurden.

Die Mutations- und Sequenzanalysen erfolgten mittels etablierter molekulargenetischer Methoden basierend auf den Vorarbeiten von Nakao et al. zum Nachweis der FLT3-ITD Mutation bzw. Noguera et al. und Scholl et al. zum Nachweis der NPM1 Mutation (Nakao et al. 1996, Noguera et al. 2005, Scholl et al. 2006).

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Analysen konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben stark mit der angewandten Therapiemodalität korreliert (Estey 2007, Pulsoni et al. 2004, Katarajan et al. 2006).

Bezüglich des Gesamtüberlebens aller kurativ therapierten Patienten ergaben sich eine mediane Überlebenszeit von 486 Tagen und ein medianes krankheitsfreies Überleben von 308 Tagen. Das mediane Überleben liegt mit ca. 16,2 Monaten deutlich über den bisher angegebenen Überlebenszeiten (Fröhling et al. 2006, Anderson et al. 2004, Löwenberg et al. 1989, Pulsoni et al. 2004, Goldstone et al. 2001, Katarajan et al. 2006). Dies spricht für die gute Wirksamkeit des verwendeten kurativen Therapieprotokolls.

Bei den palliativ therapierten Patienten zeigt sich eine relativ kurze Überlebensdauer mit einem Gesamtüberleben von durchschnittlich 63 Tagen, was unterhalb der bisher angegebenen Überlebenszeit von 3-4 Monate (Pulsoni et al. 2004) bzw. 9 Monaten Tilly et al. 1990) liegt. Insbesondere fiel die mit 3 Tagen geringe mediane Überlebenszeit bei den rein supportiv behandelten Patienten auf.

Hierzu gibt es insgesamt nur sehr wenige Vorarbeiten. Insgesamt ist eine Vergleichbarkeit schwierig, da zum einen die Entscheidung für die palliative Therapie eher nach individuellen, statt nach standardisierten Kriterien erfolgt. Zum anderen sind die palliativen Therapieprotokolle sehr different, es existieren begriffliche Unschärfen und die palliative Therapie selbst ist bisher nur selten das Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen.

Dies trifft auch für den supportiven Therapieansatz zu. Die vorliegenden Daten sind heterogen. Es gibt Arbeiten, die für supportiv behandelte Patienten deutlich längere Überlebenszeiten von zehn bis hin zu 29 Wochen beschreiben (Estey 2007, Latagliata et al. 2006). Prinzipiell unterscheiden sich die Begriffsdefinitionen einer supportiven Therapie in

den unterschiedlichen Arbeiten. Latagliata et al. verwenden den Begriff supportiv im ursprünglichen Sinne, was den zusätzlichen Einsatz von Chemotherapeutika nicht beinhaltet. Bei Estey kommen im Rahmen des als supportiv bezeichneten Therapieansatzes niedrig dosierte Chemotherapeutika wie zum Beispiel Hydroxyurea oder niedrig dosiertes Cytarabin bei entsprechender Notwendigkeit (ansteigenden Leukozytenzahlen, zunehmender Transfusions-häufigkeit) zum Einsatz (Estey 2007). Ungeachtet der begrifflichen Unschärfen lassen sich die großen Unterschiede in den Überlebensdaten der hier vorliegenden Untersuchung bezüglich der palliativen als auch der supportiven Therapien und den bereits publizierten Daten am ehesten noch durch die sehr restriktiv gehandhabte Einordnung in die beiden Therapiegruppen bzw. im Umkehrschluss eine, so anhand der klinischen Parameter realisierbar, wann immer mögliche Einordnung in den kurativen Therapiearm erklären.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen Gesamtüberleben und dem vorliegenden Karyotyp zeigt, dass das Gesamtüberleben in deutlicher Abhängigkeit vom zytogenetischen Risikoprofil der Erkrankung steht. Statistisch erwies sich diese Assoziation als signifikant ($P=0,001$). Diese Beziehung wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen herausgearbeitet und publiziert (Estey 2007, Fröhling et al. 2006, Grimwade 2001).

Bei der Betrachtung der Blutbildveränderungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der Erkrankung in Verbindung mit dem Vorhandensein einer NPM1-Mutation bzw. FLT3-ITD-Mutation wurde deutlich, dass es zwischen den initialen Thrombozytenzahlen, dem initialen Hämoglobinwert und dem Vorliegen einer der beiden Mutationen keine Beziehung gibt. Jedoch erwiesen sich sowohl die initialen Leukozytenzahlen als auch die Blastenanteile im peripheren Blut sowie im Knochenmark als statistisch signifikant erhöht, wenn eine der beiden Mutationen vorlag. Dies steht in Übereinstimmung mit den bekannten Daten aus Arbeiten für Patienten jünger als 60 Jahre bzw. dem gesamten Patientengut (Döhner et al. 2005, Schnittger et al. 2002 und 2005; Thiede et al. 2002 und 2006, Marzac et al. 2006). Auch Stirewalt et al. beschrieben den Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation und erhöhten Leukozytenzahlen, einem erhöhten Blastenanteil im peripheren Blut wie auch im Knochenmark bei den älteren Patienten (Stirewalt et al. 2001).

Der Anteil von 22,7% der Patienten mit nachgewiesener NPM1-Mutation im hier untersuchten Patientenkollektiv liegt etwas niedriger als der bis dahin für jüngere Patienten 35% (Falini et al. 2007, Döhner et al. 2005) bzw. für ein Patientenkollektiv mit Einschluss beider Altersgruppen 24%-27% (Thiede et al. 2006, Suzuki et al. 2005) beschriebene.

Betrachtet man gesondert den Zusammenhang zwischen NPM1-Mutation und dem zytogenetischen Risikoprofil fällt auf, dass bei 84% der Patienten mit einer NPM1-Mutation

parallel eine „nicht ungünstige“ zytogenetische Risikokonstellation vorliegt. Dies ist deutlich mehr, als bisher für die jüngeren Patientenkollektive beschrieben, für welche Anteile um die 50% angegeben wurden (Döhner et al. 2005, Schnittger et al. 2005, Thiede et al. 2006, Boissel et al. 2005). Eine Erklärung für den deutlich niedrigeren Anteil an NPM1-Mutationen im Gesamtpatientenkollektiv, aber dem prozentual höheren Anteil bei den zytogenetisch „nicht ungünstigen“ Veränderungen könnte sein, dass der Anteil der Patienten mit normalem Karotyp bei den Patienten über 60 Jahre kleiner ist als in der Gruppe der jüngeren Patienten (Grimwade et al. 2001, Fröhling et al. 2006, Wedding et al. 2004), reicht als vollständige Erklärung jedoch nicht aus und bedarf weiter Analysen.

Für die Analyse des Gesamtüberlebens aller kurativ therapierten Patienten ergaben sich deutliche Unterschiede in den absoluten Zahlenwerten (440 Tage ohne NPM1-Mutation vs. 884 Tage mit nachgewiesener NPM1-Mutation unabhängig vom gleichzeitigen Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation). Das Ergebnis ist nicht statistisch signifikant. Für das krankheitsfreie Überleben konnten nur geringe Unterschiede gezeigt werden (523 Tage für Patienten ohne NPM1-Mutation vs. 574 Tage für Patienten mit nachgewiesener NPM1-Mutation unabhängig vom gleichzeitigen Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation). Ein statistischer Zusammenhang besteht ebenfalls nicht. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei einer zweiten Analyse, in welcher noch einmal gesondert die NPM1-positiven Fälle ohne zusätzlichen Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation betrachtet wurden. Hier zeigten sich jedoch noch deutlichere Unterschiede in den Absolutwerten beim Gesamtüberleben (440 Tage ohne NPM1-Mutation vs. 1125 Tage mit isolierter NPM1-Mutation). Für das krankheitsfreie Überleben wurden bei dieser Analyse ebenfalls deutliche Unterschiede (523 Tage ohne NPM1-Mutation vs. 895 Tage mit isolierter NPM1-Mutation) sichtbar ohne, dass eine statistische Signifikanz belegt werden konnte. Dieses Ergebnis ist am ehesten den geringen Fallzahlen zuzuschreiben. In Anbetracht der deutlichen Unterschiede der Absolutwerte (ca. 1-2 Jahre) darf vermutet werden, dass bei der Betrachtung größerer Fallzahlen ein statistisch nachweisbarer Zusammenhang belegbar ist.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den bereits bekannten Daten für jüngere Patienten (Döhner et al. 2005., Schnittger et al. 2005, Thiede et al. 2006) bezüglich des prognostischen Zusammenhangs zwischen dem Nachweis einer NPM1-Mutation und einem längeren Gesamtüberleben bzw. krankheitsfreiem Überleben so zeigt sich eine Übereinstimmung bezüglich der positiven prognostischen Relevanz der NPM1-Mutation auch bei Patienten älter als 60 Jahre mit kurativem Therapieansatz.

Bei der Betrachtung der palliativ therapierten Patienten zeigt sich anhand der Absolutwerte der Überlebenstage interessanterweise kein Vorteil für die Überlebenszeit bei Patienten mit einer nachweisbaren NPM1-Mutation gegenüber jenen mit Nachweis eines Wildtyps (38 Tage vs. 73 Tage). Dieses Ergebnis entspricht nicht dem Erwarteten und deutet darauf hin, dass weitere Faktoren, z. B. ein intensives Therapieregime im Zusammenhang mit der positiven prognostischen Bewertung der Mutation stehen. Vergleichbare Daten aus der Literatur liegen hierzu bislang nicht vor.

Der Anteil der positiven Nachweise einer FLT3-ITD-Mutation im hier untersuchten Patientengut beträgt 16,5%. Vergleicht man die Daten dieser Analyse mit publizierten Arbeiten so liegt der Anteil deutlich unter dem von Stirewalt et al. angegebenen Anteil von 34% bei älteren Patienten. Arbeiten an jüngeren Patientenkollektiven beschrieben Anteile zwischen von 15% und 27% (Stirewalt et al. 2001, Marzac et al. 2006, Kottaridis et al. 2001, Thiede et al. 2002, Schnittger et al. 2002). In einer neueren Arbeit von Breccia et al. aus dem Jahr 2009 mit einer Analyse ausschließlich älterer Patienten zeigt einen Anteil von 9% mit einer FLT3-ITD-Mutation (Breccia et al. 2009).

Auch für die FLT3-Mutationen zeigt sich, dass über 90% der nachgewiesenen FLT3-ITD-Mutationen parallel ein „nicht-ungünstiges“ zytogenetisches Risikoprofil zeigten. Dies deckt sich mit den Daten der Vorarbeiten von Stirewalt und Anderson (Stirewalt et al. 2001, Anderson et al. 2004).

Es zeigt sich ein deutlicher negativer Einfluss bei Patienten mit FLT3-ITD-Mutation auf das Gesamtüberleben (634 Tage ohne FLT3-ITD-Mutation vs. 210 Tage mit FLT3-ITD-Mutation, $p=0,03$) und das krankheitsfreie Überleben (810 Tage bei Patienten ohne FLT3-ITD-Mutationsnachweis vs. 233 Tage für Patienten mit FLT3-ITD-Mutationsnachweis, $p=0,06$). Für das Gesamtüberleben ist der Unterschied signifikant, während für das krankheitsfreie Überleben das Signifikanzniveau knapp verfehlt wurde. Für die Absolutwerte sind die Unterschiede jedoch so deutlich, dass angenommen werden darf, dass auch hier die geringe Fallzahl ausschlaggebend für die fehlende statistische Signifikanz ist. Des Weiteren konnten für die Berechnung des krankheitsfreien Überlebens nur drei Patienten mit Erreichen einer kompletten Remission berücksichtigt werden. Die Angaben in der bisher verfügbaren Literatur sind different. So konnten Stirewalt et al. die FLT3-ITD-Mutation nicht als unabhängigen negativen Prognosefaktor bei Patienten über 60 Jahren einordnen. In mehreren größeren Untersuchungen an jüngeren Patienten (Kottaridis et al. 2001, Schnittger et al. 2002, Thiede et al. 2002, Fröhling et al. 2002) wurde die negative prognostische Bedeutung der FLT3-ITD-Mutation für Patienten jünger als 60 Jahre jedoch eindeutig belegt. Die oben schon

erwähnte Publikation von Breccia et al. bestätigt, die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse bei Patienten älter als 60 Jahre. Jedoch wurden auch hier nur geringe Fallzahlen analysiert (Breccia et al. 2009). Interessanterweise erlitten alle drei Patienten, welche FLT3-ITD-positiv waren und eine komplette Remission erreichten, ein Rezidiv.

Ebenso wie bei den kurativ behandelten Patienten finden sich Unterschiede in der Überlebenszeit bei rein palliativ therapierten Patienten in Abhängigkeit von dem FLT3-ITD-Mutationsstatus. Auch hierbei zeigt sich, dass die mediane Überlebenszeit bei Vorhandensein der FLT3-ITD-Mutation deutlich kürzer ist als bei FLT3-ITD-negativen Patienten (27 Tage vs. 63 Tage).

Der Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation ist in Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten (Stirewalt et al. 2001, Breccia et al. 2009) auch bei Patienten, die älter als 60 Jahre sind, als negativer Prognosefaktor einzuordnen. Das gilt auch für die palliativ therapierten Patienten, was sich in der Dauer der Überlebenszeit niederschlägt.

Bezüglich der Remissionsinduktion lässt sich feststellen, dass bei alleinigem Nachweis einer NPM1-Mutation ohne gleichzeitiges Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation immerhin 80 % der Patienten eine komplette Remission erreichen. Bei alleinigem Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation sind es nur 25 %, während es interessanterweise bei kombiniertem Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation und einer NPM1-Mutation 66% sind. Liegt keine der beiden Mutationen vor, wird in 41% eine komplette Remission erreicht. Dies lässt den Schluss zu, dass obwohl in dieser Analyse NPM1-Mutationen nicht sicher statistisch signifikant als positiver Prognosefaktor nachgewiesen wurden, die günstige Beeinflussung des Therapieansprechens durch das Vorhandensein einer NPM1-Mutation auch bei älteren Patienten den negativen Einfluss einer FLT3-ITD-Mutation reduziert (40% Erreichen einer CR ohne Mutationsnachweis vs. 66 % bei NPM1 und FLT3 ITD Nachweis). Die Daten hierzu aus der Literatur sind heterogen. Falini et al. (2007) und Boissel et al. (2005) fanden keinen Beziehung zwischen dem Nachweis einer NPM1-Mutation und dem Erreichen einer kompletten Remission.

Mehrere Publikationen belegen jedoch einen positiven Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer NPM1-Mutation und dem Erreichen einer kompletten Remission (Thiede et al. 2006, Döhner et al. 2006, Suzuki et al. 2005, Schneider et al. 2009), wobei sich die Daten auf ein jüngeres Patientengut beziehen oder sowohl jüngere als auch ältere Patienten einschließen. In der Veröffentlichung von Döhner et al. (2005), allerdings Patienten mit einem Alter zwischen 16 und 60 Jahren und ausschließlich einen normalem Karyotyp betreffend, wurde in Übereinstimmung zu den Ergebnissen dieser Analyse zwar das beste

Ansprechen bei Patienten mit isolierter NPM1 Mutation gesehen. Allerdings zeigt sich abweichend von den Ergebnissen dieser Analyse, dass bei einer Negativität für beide genannten Mutationen das Therapieansprechen besser ist, als wenn beide Mutationen parallel vorliegen.

Bezüglich der Remissionsinduktion beschreiben die publizierten Daten keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation und dem Therapieansprechen (Thiede et al. 2002, Fröhling et al. 2002, Schneider et al. 2009.)

Dies gilt auch für die Arbeiten zu älteren Patienten. Stirewalt et al. (2001) und Anderson et al. (2004) können keinen Zusammenhang zwischen Remissionsinduktion und einer FLT3-ITD nachweisen. Allerdings liegen bezüglich der älteren Patientengruppe nur Publikationen über Untersuchungen an kleinen Patientenkollektiven vor. Weitere Analysen größerer Patientenkollektive werden notwendig sein, um den Stellenwert der FLT3-ITD-Mutationen sowie der NPM1-Mutation, insbesondere auch bei der Gruppe der Patienten, die älter als 60 Jahre sind, sicher zu bestimmen. Dies ist auch unter dem Gesichtspunkt neuer therapeutischer Optionen in Form von FLT3-Inhibitoren bzw. FLT3-Antikörpern sowie einer genaueren Risikostratifizierung unerlässlich, um so mehr, da zielgerichtete Therapien wie z. B. durch Tyrosinkinaseinhibitoren zukünftig auch im Rahmen einer palliativ ausgerichteten Therapie zunehmend an Bedeutung gewinnen könnten.

Derzeit befinden sich eine Reihe von unspezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren (z. B. Sorafenib), speziellen FLT3-Inhibitoren (Lestaurtinib, Tandutinib u. a.) bzw. FLT3-Antikörpern (EB10) in präklinischer und klinischer Prüfung.

Bisher lässt sich anhand der Ergebnisse der Phase 1- und Phase 2-Studien sowohl für die unspezifischen Tyrosinkinasehemmer als auch für die FLT3-Inhibitoren feststellen, dass eine teilweise klinische Wirksamkeit bei tolerabler Toxizität als gesichert gilt, jedoch eine Monotherapie in den meisten Fällen nicht ausreichend wirksam ist, um eine Remissionsinduktion zu erreichen. Zudem waren die klinischen und hämatologischen Erfolge oftmals nur kurzzeitig andauernd (Knapper et al. 2006, Fiedler et al. 2005, Zhang et al. 2008, De Angelo et al. 2006). Es sind jedoch auch Kasuistiken beschrieben, in denen beispielsweise durch eine Monotherapie mit Sorafenib im Rezidiv nach allogener Blutstammzelltransplantation eine molekulare Remission erzielt wurde (Safaian et al. 2009).

Der kombinierte Einsatz mit der bekannten zytostatischen Therapie befindet sich in Prüfung. In vitro-Experimente, z. B. die Kombination von Tandutinib und Idarubicin/Ara C, belegen den synergistischen Effekt von FLT3-Inhibition und Chemotherapie, der auch eine

Dosisreduktion des Zytostatikums bei erhaltenem antileukämischem Effekt möglich macht (Schittenhelm et al. 2009).

Die hier gezeigten Daten weisen in Übereinstimmung mit den zuvor für jüngere Patienten publizierten Arbeiten darauf hin, dass sowohl die molekularen Marker NPM1 als auch FLT3 bzw. deren Mutationen sehr hilfreich bei der Risikostatifizierung insbesondere bei den zytogenetisch „nicht ungünstigen“ Veränderungen mit intermediärem Risiko dienen können. So zeigt sich bei Vorliegen einer NPM1- Mutation eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufes im Zusammenhang mit einer intensiven Chemotherapie. Der Nachweis einer FLT3-ITD-Mutation wirkt sich hingegen prognostisch negativ aus. Wie Büchner et al. gezeigt haben, bringt eine weitere Intensivierung der Induktionschemotherapie jedoch keine weiteren Vorteile für den Krankheitsverlauf (Büchner et al. 2009), so dass andere therapeutische Alternativen zum einen im Hinblick auf die Remissionsinduktion und zum anderen für die Erhaltung einer Remission gefragt sind. Neben der zielgerichteten Therapie in Kombination mit der konventionellen Chemotherapie stellt sich daher auch die Frage einer intensivierten Postremissionstherapie bei FLT3-ITD-positiven Patienten, um ein ansonsten sehr wahrscheinliches Rezidiv zu verhindern. Durch die weitere Optimierung der Therapieprotokolle bei der allogenen Stammzelltransplantation, etwa durch reduzierte Konditionierungstherapien bzw. nicht-myeloablative Therapieprotokolle, erscheint dies auch unter Berücksichtigung des Alters der Patienten unter Abwägung des Nutzen/Risikoprofils eine überprüfenswerte Option für Patienten mit einer nachweisbaren FLT3-ITD-Mutation nach Erreichen einer kompletten Remission. Eine aus dem Jahre 2005 stammende Publikation von Gale et al. konnte anhand einer statistischen Analyse von 1135 Patienten im Alter zwischen 16 und 85 Jahren keinen statistisch signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit oder ohne FLT3-IDT-Mutation, welche eine allogene Blutstammzelltransplantation erhielten, sichern wobei sich jedoch ein Trend dahingehend zeigt, dass krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben bei FLT3-positiven Patienten durch eine allogene Blutstammzelltransplantation positiv beeinflusst werden (Gale et al. 2005). Andere Analysen von Schlenk et al. und Bornhäuser et al. sehen hingegen einen deutlichen prognostischen Vorteil für die allogene Blutstammzelltransplantation bei FLT3-ITD-positiven Patienten gegenüber einer alleinigen konsolidierenden Chemotherapie (Schlenk et al. 2008, Bornhäuser et al. 2007). Die Daten liegen für Patienten bis 60 Jahre vor und werden kontrovers diskutiert. Generell gilt, dass für Patienten jünger als 60 Jahre der prognostische Vorteil einer allogenen Blutstammzelltransplantation bei vorhandenem Stammzellspender und einem „Nicht-Vorhandensein“ von prognostisch positiven

zytogenetischen Veränderungen belegt ist. Bei älteren Patienten bis 70 Jahre bei Fehlen relevanter Komorbiditäten besteht in der Rezidivsituation eine Indikation für eine allogene Blutstammzelltransplantation, unabhängig vom Karyotyp der Erkrankung (Zander et al. 2008). Inwieweit ein zytogenetisches Risikoprofil bzw. das Vorhandensein prognostisch negativer molekularer Marker, wie etwa die FLT3-ITD Mutation die Indikationsstellung zur allogenen Blutstammzelltransplantation auch bei älteren Patienten und somit auch den Krankheitsverlauf beeinflussen kann, muss in Studien überprüft werden. Ein interessanter Ansatz hierfür könnte unter Beachtung des Alters der Patienten sowie der Komorbiditäten beispielsweise die nicht-myeloablative Blutstammzelltransplantation sein.

Die medianen Überlebenszeiten aller palliativ therapierten Patienten, aufgeteilt nach den molekularen Subgruppen, liegen zwischen 27 und 73 Tagen mit dem schlechtesten Ergebnis bei der Gruppe ohne NPM1-Mutation aber Vorliegen einer FLT3-Mutation. Vergleichbare Daten fehlen bislang. Auch diesbezüglich müssen weitere Analysen an größeren Patientenkollektiven abgewartet werden. Insbesondere unter der Berücksichtigung neuerer therapeutischer Optionen wie den Tyrosinkinaseinhibitoren bzw. FLT3-Inhibitoren sind diese Analysen sind auch bei der relativ geringen Lebenserwartung nicht zuletzt aus ethischer Sicht unerlässlich, da diese prinzipiell auch unter palliativen Gesichtspunkten einen Gewinn an Lebenszeit bei relativ moderater Toxizität bringen können.

Weiterhin sind sowohl die FLT3-ITD-Mutation als auch die NPM1 Mutation prinzipiell als molekularer Marker für die Diagnostik einer minimalen Resterkrankung denkbar. Allerdings ist die Wertigkeit noch nicht sicher geklärt. So werden für die FLT3-ITD- Mutation verschiedene Mutationsmuster und Instabilitäten derselben im Verlauf einer Krankheit beschrieben (Shih et al. 2002, Kottaridis et al. 2002, Palmisano et al. 2007). Hingegen scheint die NPM1-Mutation im Verlauf einer Erkrankung stabil zu bleiben und somit gut als molekularer Marker im Sinne der Diagnostik einer minimalen Resterkrankung nutzbar (Palmisano et al. 2007, Barragan et al. 2008). Selbstverständlich müssen auch hier weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven folgen, um die Wertigkeit der beiden Mutationen als Marker im Sinne der minimalen Resterkrankung zu evaluieren.

Daran anschließen würde sich die Frage, inwieweit eine suffiziente MRD-Diagnostik die therapeutischen Strategien, beispielsweise bei einem drohenden Rezidiv, insbesondere bei den älteren Patienten beeinflussen kann.

VI. Schlussfolgerungen

In der hier durchgeführten Analyse konnte ein deutlicher Trend hinsichtlich eines verlängerten krankheitsfreien Überlebens sowie Gesamtüberlebens für die in kurativer Intention behandelten AML-Patienten mit isolierter NPM1-Mutation aufgezeigt werden. Dies gilt für den Vergleich mit der molekulargenetischen Subgruppe von Patienten, welche weder eine NPM1- noch eine FLT3-ITD-Mutation besitzen. Obgleich sich hier bei insgesamt kleiner Fallzahl keine statistische Signifikanz demonstrieren ließ, so sind die Absolutwerte, beispielsweise für das Gesamtüberleben (1125 Tage versus 440 Tage) deutlich different. Zudem zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Trend für die positive Beeinflussung der krankheitsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens bei parallelem Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation und einer NPM1-Mutation. Auch die Rate an erreichten kompletten Remissionen ist in beiden genannten Gruppen, also mit isolierter NPM1-Mutation als auch bei kombiniertem Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation und einer NPM1-Mutation deutlich höher als bei Patienten ohne Vorliegen einer der beiden Mutationen bzw. dem Vorliegen einer isolierten FLT3-ITD-Mutation. In Anbetracht der deutlichen Unterschiede der Absolutwerte kann trotz fehlender statistischer Signifikanz die Hypothese aufgestellt werden, dass bei größerer Fallzahl in Analogie zu AML-Patienten kleiner 60 Jahren das Vorhandensein einer isolierten NPM1-Mutation auch bei älteren AML-Patienten als positiver prognostischer Parameter aufgezeigt werden kann. Die These wird durch eine aktuell von Becker et al. publizierten Arbeit unterstützt (Becker et al. 2010). Eine unmittelbare therapeutische Konsequenz ergibt sich daraus nicht, außer dass unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die NPM1 Mutation nur im Falle eines kurativen und somit intensiven Therapieansatzes einen prognostischen Vorteil aufweist, wann immer möglich, dieser Ansatz gewählt werden sollte. Eine intensivierte Postremissionstherapie, wie etwa eine allogene Stammzelltransplantation bei Vorhandensein eines HLA-identen Geschwisterspenders scheint derzeit nicht indiziert. Bei Vorliegen einer isolierten FLT3-ITD-Mutation zeigen sich ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben. Die Rate der erreichten Komplettremissionen ist die niedrigste im Vergleich der untersuchten Gruppen. Bezüglich des Vorliegens FLT3-ITD-Mutation sind jedoch verschiedene therapeutische Konsequenzen denkbar. Dies ist zum einen der Einsatz von zielgerichteten FLT3-Inhibitoren, deren Wirksamkeit derzeit in Studien überprüft wird. Aber auch eine intensivierte Postremissionstherapie, wie zum Beispiel die allogene Blutstammzelltransplantation bei älteren Patienten mit einer AML, insbesondere zwischen 60 und 70 Jahren, ist bei Vorliegen

einer prognostisch ungünstigen FLT3-ITD-Mutation zukünftig in Erwägung zu ziehen bzw. sollte in klinischen Studien überprüft werden.

Bei einem palliativen Therapieansatz findet sich kein Überlebensvorteil bei Vorliegen der NPM1-Mutation im Vergleich zu den Patienten ohne Mutationsnachweis. Jedoch zeigt sich auch hier, dass die negative Wertigkeit der FLT3-ITD-Mutation durch das zusätzliche Vorhandensein einer NPM1-Mutation aufgehoben, im Vergleich zu den kurativ therapierten Patienten aber nicht verbessert wird. Die klinische Wertigkeit dieser Beobachtung wird erst nach weiteren Analysen zu beurteilen sein. Zudem lässt sich auch in dieser Patientengruppe ein Trend zu einer negativen Beeinflussung des Gesamtlebens bei Vorliegen einer FLT3-ITD-Mutation erkennen. Insbesondere unter Berücksichtigung der insgesamt sehr kurzen Überlebenszeiten bei einem palliativen Therapieansatz ist die weitere Prüfung der zielgerichteten FLT3-Inhibition gerade auch für diese Patientengruppe sehr interessant und sollte daher gezielt in klinischen Studien untersucht werden.

VII Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. 2001.
Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 113(4):983-8.
- Andersson A, Johansson B, Lassen C, Mitelman F, Billström R, Fioretos T. 2004.
Clinical impact of internal tandem duplications and activating point mutations in FLT3 in acute myeloid leukemia in elderly patients. *Eur J Haematol*, 72(5):307-13.
- Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, Anderson JE, Petersdorf SH. 2006. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9):3481-5.
- Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. 2008. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood*, 111(5):2527-37.
- Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. 2006. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*, 107(10):3847-53.
- Baldus C, Mrozek K, Marucci G, Bloomfield CD. 2007. Clinical outcome of de novo leukaemia patients with normal Cytogenetics is affected by molecular genetic alteration: a Concise review. *British Journal of haematology*, 137:387-400.
- Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. 2003. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1613-8.
-

- Barragan E, Pajuelo JC, Ballester S, Fuster O, Cervera J, Moscardo F, Senent L, Such E, Sanz MA, Bolufer P. 2008. Minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia by mutant nucleophosmin (NPM1): comparison with WT1 gene expression. *Clinica chimica acta*, 395(1-2):120-3.
- Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Koltz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. 2010. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. 2010, 28(4):596-604.
- Bianchini M, Ottaviani E, Grafone T, Giannini B, Soverini S, Terragna C, Amabile M, Piccaluga PP, Malagola M, Rondoni M, Bosi C, Baccarani M, Martinelli G. 2003. Rapid detection of Flt3 mutations in acute myeloid leukemia patients by denaturing HPLC. *Clin Chem*, 49(10):1642-50.
- Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T. 2005. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res*, 11(4):1416-24.
- Blaise D, Vey N, Faucher C, Mohty M. 2007. Current status of reduced-intensity-conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92(4):533-41.
- Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Rauffoux E, de Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C. 2005. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*, 106(10), 3618-3620.
- Bornhäuser M, Illmer T, Schaich M, Soucek S, Ehninger G, Thiede C; AML SHG 96 study group. 2007. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML. *Blood*, 109(5):2264-5.

- Breccia M, Frustraci AM, Canella L, Stefanizzi C, Latagliata R, Cartoni C, Diverio D, Gurarini A, Mauro N, Rago A, Cimino G, Alimena G. 2009. Comorbidities and FLT3-ITD abnormalities as Independent Prognostic indicators of Survival in Elderly Acute Myeloid Leukaemia Patients. *Hematol Oncol*, 27(3):148-53.
- Büchner T, Berdel WE, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. 2009. Age Related Risk Profile and Chemotherapy Dose Response in Acute myeloid Leukemia: A study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *Journal of clinical Oncology*, 27(1):61-69.
- Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrózek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao PN, Herzig GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD. 1998. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res*, 58(1):55-9.
- Christ O, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Buske C. 2007. Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie. *Medizinische Klinik*, 102:290-295.
- Craig CM, Schiller GJ. 2008. Acute myeloid leukemia in the elderly: conventional and novel treatment approaches. *Blood Rev*, 22(4):221-34.
- DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, Caligiuri MA, Cooper MR, Lecerf JM, Karol MD, Sheng S, Holford N, Curtin PT, Druker BJ, Heinrich MC. 2006. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. 108(12):3674-81.
- Dehmel U, Zaborski M, Meierhoff G, Rosnet O, Birnbaum D, Ludwig WD, Quentmeier H, Drexler HG. 1996. Effects of FLT3 ligand on human leukemia cells. I. Proliferative response of myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 10 (2):261-70.

- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rückner FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H. 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal Cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood*, 106:3740–3746.
- Dreschler B, Lübbert M, Acute myeloid Leukemia: Epidemiology und Ethiology, *Cancer*, 107(9): 2099-2107.
- Drexler HG. 1996. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 10(4):588-99.
- Estey E. 2007. Acute myeloid Leukemia und Myelodysplastic Syndromes in Older Patients. *Journal of clinical Oncology*, 25(14):1908-1915.
- Estey E, Döhner H. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368:1894-907.
- Estey E, de Lima M, Tibes R, Pierce S, Kantarjian H, Champlin R, Giralto S. 2007. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, 109(4):1395-400.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF. GIMEMA Acute Leukemia Working Party. 2005. Cytoplasmatic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*, 352:254-66.
- Falini B, Nicoletti I., Martelli MF, Mecucci C. 2007. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmatic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*, 109(3): 874-85.

- Farag SS, Archer KJ, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR, Ning Y, Mayer RJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. 2006. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*, 108(1):63-73.
- Fiedler W, Serve H, Döhner H, Schwittay M, Ottmann OG, O'Farrell AM, Bello CL, Allred R, Manning WC, Cherrington JM, Louie SG, Hong W, Brega NM, Massimini G, Scigalla P, Berdel WE, Hossfeld DK. 2005. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*, 105(3):986-93.
- Fritsch S, Buske C, Wörmann B, Wedding U, Hiddemann W, Spiekermann K. 2007. Therapy of acute myeloid leukemia (AML) for medically non-fit patients *Med Klin (Munich)*, 102(4):324-9.
- Fröhling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. 2002. AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid 100(13):4372-80.
- Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H. 2006. Cytogenetics and Age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia Patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*, 108(10):3280-3288.
- Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. 2004. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*, 22(4):624-33.

- Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Döhner H, Döhner K; German-Austrian AML Study Group. 2009. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*, 113(19):4505-11.
- Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, Linch DC. 2005. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood*, 106(10):3658-65.
- Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program*, 80-97.
- Gilliland DG, Griffin JD. 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100(5):1532-1542.
- Goldstone AH, Burnett AK, Wheatley K, Smith AG, Hutchinson RM, Clark RE; Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. 2001. Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98(5):1302-11.
- Hiddemann W, Kern W, Schoch C. 1999. Management of acute myeloid Leukemia in elderly Patients, *J Clin Oncology*, 17:3569-3576.
- Van der Holt B, Breems DA, Beverloo B, van der Berg E, Burnett A, Sonneveld P, Löwenberg B. Various distinctive cytogenetic abnormalities in Patients with acute myeloid leukaemia aged 60 years and older express adverse prognostic value: results from a prospective clinical trial, *British Journal of Haematology*, 136, 96-105.

- Jiang J, Paez JG, Lee JC, Bo R, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Wolpin BM, Jonasova A, Herman P, Fox EA, Boggon TJ, Eck MJ, Weisberg E, Griffin JD, Gilliland DG, Meyerson M, Sellers WR. 2004. Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood*, 104(6):1855-8.
- Knudson, AG Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl Acad. Sci*, 68:820–823
- Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Wierda W, Pierce S, Shan J, Estey E. 2006. Result of intensive Chemotherapy in 998 Patients Age 65years or older with acute myeloid Leukemia or High-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Cancer*, 106(5):1090-1098.
- Kern W, Behre G, v.Schilling Ch, Haferlach T, Adorf D, Jehn U, Waterhouse C, Brack N, Schnittger S, Petrides, W, Hiddemann W. 2003. Akute myeloische Leukämie (AML) beim Erwachsenen. *Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*, <http://tumorzentrum-muenchen.de>, 17-44.
- Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, Kell WJ, Agrawal S, Chopra R, Clark R, Levis MJ, Small D. 2006. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood*, 108(10):3262-70.
- Kuendgen A, Germing U. 2009. Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. *Cancer Treat Rev*, 35(2):97-120.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. 2001. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 15;98(6):1752-9.

- Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. 2002. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*, 100(7):2393-8.
- Latagliata R, Bongarzone V, Carmosino I, Mengarelli A, Breccia M, Borza PA, D'Andrea M, D'Elia GM, Mecarocci S, Morano SG, Petti MC, Mandelli F, Alimena G. 2006. Acute myelogenous leukemia in elderly patients not eligible for intensive chemotherapy: the dark side of the moon. *Ann Oncol*, 17(2):281-5.
- Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. 1999. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*, 94(3):1086-99.
- Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. 1997. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood*, 89(9):3323-9.
- Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. 2005. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*, 19(3):329-34.
- Levis M, Small D. 2003. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia*, 17:1738-1752.
- Li L, Piloto O, Kim KT, Ye Z, Nguyen HB, Yu X, Levis M, Cheng L, Small D. 2007. FLT3/IDT expression increases expansion, survival and entry into Cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *Br J Haematol*, 137(1):64-75.
- Lim MJ, Wang XW. 2006. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev*, 30(6):481-90.

- Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. 2003. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 82-101.
- Marzac C, Teyssandier I, Calendini O, Perrot JY, Faussat AM, Tang R, Casadevall N, Marie JP, Legrand O. 2006. Flt3 internal tandem duplication and P-glycoprotein functionality in 171 patients with acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 12(23):7018-24.
- Metzelder S, Wang Y, Wollmer E, Wanzel M, Teichler S, Chaturvedi A, Eilers M, Enghofer E, Neubauer A, Burchert A. 2009. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 113(26):6567-71.
- Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. 2007. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2):431-48.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. 1996. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10(12):1911-8.
- Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, Urano T. 2006. Nucleophosmin: a versatile molecule Associated with hematological malignancies. *Cancer Sci*, 97(10):963-9.
- Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, Lavorgna S, Divona M, Buccisano F, Amadori S, Mecucci C, Falini B, Lo-Coco F. 2005. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19(8):1479-82.
- Palmisano M, Grafone T, Ottaviani E, Testoni N, Baccarani M, Martinelle G. 2007. NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92(9):1268-9.

- Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. 2008. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*, 1;26(28):4595-602.
- Piccaluga PP, Bianchini M, Martinelli G. 2003. Novel FLT3 point mutation in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*, 4(10):604.
- Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, Rao N, Arowojolu O, Stine A, Shiotsu Y, Shudo A, Akinaga S, Small D, Karp JE, Levis M. 2009. A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood*, 113(17):3938-46.
- Pulsoni A, Pagano L, Lataglia R, Casini M, Cerri R, Crugnola M, De Paoli L, Di Bona E, Invernizzi R, Marmont F, Petti MC, Rigolin G, Ronco F, Spadano A, Tosti ME, Visani G, Mele A, Mandelli F. 2004. Survival of elderly patients with acute myeloid leukaemia. *Haematologica*, 89:296-302.
- Quentmeier H, Martelli MP, Dirks WG, Bolli N, Liso A, Macleod RA, Nicoletti I, Mannuccis R, Pucciarini A, Bigerna B, Martelli MF, Mecucci C, Drexler HG, Falini B. 2005. Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia*, 19(10):1760-7.
- Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. 2000. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia*, 14(4):675-83.
- Safaian NN, Czibere A, Bruns I, Fenk R, Reinecke P, Dienst A, Haas R, Kobbe G. 2009. Sorafenib (Nexavar) induces molecular remission and regression of extramedullary disease in a patient with FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, 33(2):348-50.

- Sanz M, Burnett A, Lo-Coco F, Löwenberg B. 2009. FLT3 inhibition as a targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 21(6):594-600.
- Schaich M, Ehninger G. 2006. Diagnostik und Therapie der akuten Myeloischen Leukämie des Erwachsenen. *Der Onkologe*, 12:1003-1011.
- Schittenhelm MM, Kampa KM, Yee KW, Heinrich MC. 2009. The FLT3 inhibitor tandutinib (formerly MLN518) has sequence-independent synergistic effects with cytarabine and daunorubicin. *Cell Cycle*, 8(16):2621-30.
- Schlenk RF, Döhner K, Kneba M, Götze K, Hartmann F, Del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Fröhling S, Döhner H. German-Austrian AML Study Group (AMLSG). 2009. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica*, 94(1):54-60.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. 2008. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 358(18):1909-18.
- Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, Mellert G, Zellmeier E, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C, Braess J, Fritsch S, Heinecke A, Sauerland MC, Berdel WE, Buechner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K. 2009. NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, 113(21):5250-3.
- Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Griesinger F. 2000. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia*, 14(5):796-804.

- Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. 2002. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease *Blood*, 100(1):59-66.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. 2005. Nucleophosmin gene mutations are Predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106: 3733–3739.
- Schoch C, Kern W, Schnittger S, Büchner T, Hiddemann W, Haferlach T. 2004. The Influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica*, 89(9):1082-90.
- Scholl S, Mügge LO, Landt O, Loncarevic IF, Kunert C, Clement JH, Höffken K. 2007. Rapid screening and sensitive detection of NPM1 (nucleophosmin) exon 12 mutations in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*, 31:1213-1219.
- Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL, Hsu HC. 2002. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*, 100(7):2387-92.
- Small D. 2006. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology*, 178-184.
- Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. 2001. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 97(11):3589-95.
- Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. 2004. Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 124(4):481-4.

- Stone RM, O'Donnel MR Sekeres M. 2004. Akute Myeloid Leukemia, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 98-117.
- Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodaera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. 2005. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukaemia. *Blood*, 106(8):2854-61.
- Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer Th, Ehninger G. 2006. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107(10): 4011-4020.
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. 2002. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99(12):4326-35.
- Tilly H, Castaigne S, Bordessoule D, Casassus P, Le Pris  PY, Tertian G, Desablens B, Henry-Amar M, Degos L. 1990. Low-dose cytarabine versus intensive chemotherapy in the treatment of acute nonlymphocytic leukemia in the elderly. *J Clin Oncol*, 8(2):272-9.
- Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. 2005. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established geneexpression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*, 106:3747-3754.

- Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, Allen C, Green C, Quentmeier H, Drexler H, Burnett A, Linch D, Bonnet D, Lister TA, Fitzgibbon J. 2008. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*, 26(33):5429-35.
- Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci PG, Eilers M. 2008. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth *Nat Cell Biol*, 2008 10(9):1051-61.
- Wedding U, Bokemeyer C, Meran JG. 2003. Alte Patienten mit akuter myeloischer Leukämie – Charakteristika der Biologie, des Patienten und der Therapie. *Medizinische Klinik*; 98:193-207.
- Wedding U, Bokemeyer C, Meran JG; Working Group Geriatric Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (DGHO); Austrian Society for Haematology and Oncology (OGHO); German Society for Geriatrics (DGG). 2004. Elderly patients with acute myeloid leukaemia: characteristics in biology, patients and treatment. Recommendations of the Working Group Geriatric Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (DGHO), the Austrian Society for Haematology and Oncology (OGHO) and the German Society for Geriatrics (DGG). *Onkologie*, 27(1):72-82.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies *Blood*, 97(8):2434-9.
- Youn BS, Mantel C, Broxmeyer HE. 2000. Chemokines, Chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*, 17: 150-174.

- Zander AR, Bacher U, Finke J. 2008. Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: establishment of indications on the basis of individual risk stratification. *Dtsch Arztebl Int.*, 105(39):663-9.
- Zhang W, Konopleva M, Shi YX, McQueen T, Harris D, Ling X, Estrov Z, Quintás-Cardama A, Small D, Cortes J, Andreeff M. 2008. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in Acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst*, 100(3):184-98.
- Zarrinkar PP, Gunawardane RN, Cramer MD, Gardner MF, Brigham D, Belli B, Karaman MW, Pratz KW, Pallares G, Chao Q, Sprankle KG, Patel HK, Levis M, Armstrong RC, James J, Bhagwat SS. 2009. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 114(14):2984-92.

VII Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen habe.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof Höffken für die freundliche Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit.

Ebenso danken möchte ich Herrn Dr. H.J. Clement, Leiter des onkologischen Forschungslabors sowie seinem Team für die guten Arbeitsmöglichkeiten und die wertvolle Unterstützung beim Erlernen der Arbeitstechniken und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. med habil S. Scholl für die Unterstützung bei der Planung und Erstellung dieser Arbeit, insbesondere aber für seine Umsicht, das Vertrauen, das Verständnis und die Geduld, die mir in schwierigen Zeiten entgegengebracht wurden.

Gesondert Danken möchte ich weiterhin Herrn Chefarzt Dr. med habil. Ullrich Wedding für die Unterstützung bei den statistischen Anlaysen und die Beantwortung vieler kleiner Zwischenfragen.

Meiner Mutter danke ich für ihr mathematisches Grundverständnis und die kleinen Hilfstellungen am Ende des Weges und meiner Freundin Susan Guennoc danke ich ganz besonders für den Glauben an meine Person.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. Sebastian Scholl, Klinik für Innere Medizin II, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Dr. med. Ulrich Wedding, Klinik für Innere Medizin II, Friedrich-Schiller-Universität, Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena den, 23. März 2010

Claudia Theuer

Lebenslauf**Claudia Theuer**

Fuchslöcherstrasse 24
07749 Jena
Tel. 03641-207437
claudia.theuer@med-uni-jena.de

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 16.06.1974
Geburtsort: Stendal
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

09/1980 – 09/1989	Allgemeinbildende Oberschule Bettenhausen
09/1989 - 08/1990	Allgemeinbildene Oberschule Finsterbergen
09/1990 – 07/1993	Gymnasium “ Salzmannschule” in Schnepfenthal (Thüringen)
	Abschluss Abitur

Studium:

10/1993 – 10/2000	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena/Thüringen
09/1995	Ärztliche Vorprüfung
09/1997	1. Staatsexamen
09/1999	2. Staatsexamen
10/1999 – 02/2000	PJ-Tertial Gynäkologie, Sophien-und Hufeland Klinikum Weimar
02/2000 – 06/2000	PJ-Tertial Innere Medizin, Klinik für Hämatologie Onkologie der FSU Jena
06/2000 – 09/2000	PJ Tertial Chirurgie Klinik für Herz-Thorax und Gefäßchirurgie der FSU-Jena
10/2000	3. Staatsexamen und Erlangung der Approbation als Arzt
07/2006 – 03/2010	Promotionsarbeit Klinik für Hämatologie/Onkologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 01/2001	Assistenzärztin, Klinik für Hämatologie/onkologie der FSU Jena